Jörg Tittor

REAKTIONSKINETISCHE BESCHREIBUNG DER ELEKTROGENEN Cl^--PUMPE VON ACETABULARIA DURCH ANALYSE DER SUBSTRATABHÄNGIGKEIT DER STROM-SPANNUNGSKURVEN UND DER SPANNUNGS-ABHÄNGIGKEIT ELEKTRISCHER FREQUENZGÄNGE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von

Jörg Tittor
aus Ellwangen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547613_0009

REAKTIONSKINETISCHE BESCHREIBUNG DER ELEKTROGENEN Cl^--PUMPE VON ACETABULARIA DURCH ANALYSE DER SUBSTRATABHÄNGIGKEIT DER STROM-SPANNUNGSKURVEN UND DER SPANNUNGSABHÄNGIGKEIT ELEKTRISCHER FREQUENZGÄNGE

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von

Jörg Tittor

aus Ellwangen

1983

Tag der mündlichen Prüfung	7. Juli 1983
Dekan	Prof. Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter	PD Dr. D. Gradmann
2. Berichterstatter	Prof. Dr. A. Hager

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1. Tabelle der verwendeten Abkürzungen und Symbole 6

2. Einleitung 8

2.1 Einführung in die Thematik der Arbeit 8

2.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung 10

2.3 Theorie 11

2.3.1 Das 6-Zustandsmodell 11

2.3.2 Das 3-Zustandsmodell 18

2.3.3 Das 2-Zustandsmodell 20

3. Material und Methoden 25

3.1 Material 25

3.2 Methoden 27

3.2.1 Versuchsaufbau 27

3.2.2 Elektrischer Meßkreis 27

3.2.3 Kabelprobleme 29

3.2.4 Registrierung und Auswertung der Stromspannungskurven 31

3.2.5 Auswertung der gemessenen Stromspannungskurven mithilfe eines Rechnerprogramms 33

3.2.6 Registrierung und Auswertung der Frequenzgänge 34

3.2.7 Test der Methode durch einen Ersatzschaltkreis 36

4. Ergebnisse 38

4.1 Einfluß des Substrats auf die Stromspannungskurve der Pumpe 38

4.1.1 Messung der elektromotorischen Kraft der Pumpe 38

4.1.2 Messung der Stromspannungskurven 40

4.2 Einfluß der Cl^--Außenkonzentration auf die stationären Membranstromspannungskurven 50

4.3 Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Impedanz der Cl^--Pumpe 55

4.3.1 Nachweis der linearen Übertragungseigenschaften der Pumpe 55

4.3.2 Messung der Frequenzgänge bei verschiedenen Membranspannungen 57

4.3.3 Auswahl der geeigneten Übertragungsfunktion 59

4.3.4 Ergebnisse der Kurvenanpassungen 60

4.3.5 Darstellung der Ergebnisse mithilfe eines Ersatzschaltbildes 64

5. Diskussion 69

5.1 Veränderte Cl^--Konzentration 69

5.1.1 Elektromotorische Kraft der Pumpe 69

5.1.2 Das 3-Zustandsmodell und Stromspannungskurven 71

- Substratspezifität 73

- Enzymkinetische Bedeutung 74

5.1.3 Alternativen 78

- Ladung des Carriermoleküls 78

- Veränderung von k_{cb} und k_{ca} 81

- unkompetitive Hemmung 82

5.1.4 Schlüsse 84

5.2 Substratabhängigkeit der stationären Stromspannungskurven der Membran 84

5.3 Erweiterung der Diskussion der reaktionskinetischen Modelle auf den nicht-stationären Bereich 87

6. Zusammenfassung 95

7. Literaturverzeichnis 97

8. Lebenslauf 102

UNIV. LEIDEN BIBL.

1. Tabelle der verwendeten Abkürzungen und Symbole

Symbol	Erklärung	Maßeinheit
ADP	Adenosindiphosphat	
ATP	Adenosintriphosphat	
Cl^-	Chlorid	
c_m	Kapazität der Membran	$F\ m^{-2}$
c_p	Kapazität der Pumpe	$F\ m^{-2}$
ECP	Elektrogene Cl^--Pumpe	
F	Faradaykonstante (96000)	$C\ mol^{-1}$
ΔG	Freie Enthalpie	$J\ mol^{-1}$
g_o	stationäre Leitfähigkeit	$S\ m^{-2}$
g_{pmax}	maximale Leitfähigkeit der Pumpe	$S\ m^{-2}$
g_s	serielle Leitfähigkeit	$S\ m^{-2}$
HCO_3	Bicarbonat	
HSW	Spannungswert, nach dem der halbmaximale Sättigungsstrom erreicht ist	V
I^-	Jodid	
i_u	unidirektioneller Strom	$A\ m^{-2}$
IU-Kurve	Stromspannungskurve	
k_{ij}	Geschwindigkeitskonstante von i nach j	s^{-1}
K_m	Michaeliskonstante	M
KSW	Künstliches Seewasser	
N_i	Dichte des Zustands X_i	$mol\ m^{-2}$
R	Gaskonstante	$J\ K^{-1}\ mol^{-1}$
r_i	Reservefaktor	

r_o	$= 1/g_o$	Ohm m^2
r_s	$= 1/g_s$	Ohm m^2
T	Absolute Temperatur	K
μ	chemisches Potential	V
v_{max}	Maximale Geschwindigkeit	mol s^{-1}
V_m	Membranspannung	V
X_i	i-ter Zustand im Carrierzyklus	

2. Einleitung

2.1 Einführung in die Thematik der Arbeit

Der Erfolg der chemiosmotischen Hypothese (Mitchell 1961) führte zu der allgemeinen Erkenntnis, daß Stoffwechsel und Elektrik eng miteinander verbunden sind. Es dauerte allerdings einige Zeit, bis die Begriffe der Enzymkinetik, wie Konzentration, Michaeliskonstante, maximale Geschwindigkeit, in den Begriffen der Elektrophysiologie, wie Membranspannung, Leitfähigkeit, elektromotorische Kraft ihre Entsprechung fanden. Mitchell hatte gezeigt, daß die Freie Enthalpie ΔG der terminalen Phosphatbindung des ATP das Äquivalent eines elektrochemischen Gradienten μ und damit die treibende Kraft für Ionen sein kann. Anders ausgedrückt:

$$\Delta G/F = \Delta\mu = V_m + RT/F \ln([H^+]_1/[H^+]_2) \qquad 1$$

Mit dieser Äquivalenz konnte man erstmals den Vorgang der ATP-Synthese an der inneren Mitochondrienmembran, bzw während der Lichtreaktion der Photosynthese an der Thylakoidmembran erklären. Durch den Elektronentransport wird ein elektrochemischer Protonengradient über der jeweiligen Membran aufgebaut, der dann durch ATP-synthetisierende Enzyme genutzt werden kann, um aus ADP und anorganischem Phosphat ATP zu bilden.

Die Umkehrung dieses Vorgangs, Stofftransport unter Verbrauch der freiwerdenden Energie bei Hydrolyse von ATP,

aber auch Reduktion von $NADH+H^+$ (Wikström 1973) oder Decarboxylierung von Oxalacetat (Dimroth 1982) zur Erzeugung von elektrochemischen Gradienten nennt man aktiven Transport. Ist dieser mit dem Nettotransport einer elektrischen Ladung verbunden, so spricht man von einer elektrogenen Pumpe.

Nachdem nun die prinzipiellen energetischen Eigenschaften der Transportsysteme quantitativ erfaßbar waren, wurde nach deren zeitlichen Verhalten gefragt. Die reaktionskinetische Beschreibung passiver Transportsysteme (Läuger und Stark 1970), von Nervenerregung (Goldman und Hahin 1978, Conti et al. 1980), synaptischer Übertragung (Rosenberry 1979, Sakmann et al. 1980) und elektrogener Ionenpumpen (Läuger 1979, Hladky 1980, Hansen et al. 1981, Gradmann et al. 1982a) erwies sich als leistungsfähige Möglichkeit, so komplexe Transportvorgänge auf reaktionskinetischer Basis zu verstehen und quantitativ befriedigend zu beschreiben. (Die Literaturangaben sind Beispiele.)

Die reaktionskinetische Betrachtungsweise hat zum Ziel, mathematisch das stationäre und nicht-stationäre Verhalten eines (Transport)Systems möglichst exakt zu beschreiben und die Reihenfolge einzelner Reaktionsschritte zu bestimmen. Weiterhin können dann Aussagen über die Stöchiometrie und Energetisierung von Reaktionen gemacht werden. Die zugrundeliegenden molekularen Strukturen werden mit diesem Ansatz nicht untersucht.

2.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Durch die Verbindung von Elektrophysiologie und Reaktionskinetik sollen die kinetischen Eigenschaften der elektrogenen Cl^--Pumpe (ECP) von Acetabularia untersucht werden.

Dazu werden stationäre Stromspannungskurven (IU-Kurven) unter verschiedenen Cl^--Außenkonzentrationen aufgenommen. Dadurch werden die Geschwindigkeitskonstanten für Cl^- Bindung und Abgabe an der Außenseite der Membran numerisch erfaßt. Die Beschreibung und Analyse dieser Experimente bilden einen Schwerpunkt dieser Arbeit.

Andererseits kann man durch die Analyse des stationären Verhaltens nur die relativen Werte der Geschwindigkeitskonstanten ermitteln, zur Angabe der absoluten Werte benötigt man die Dichte der Purpurmoleküle N. Diese Dichte wirkt in Gleichung (9) als Skalierungsfaktor. Zur Bestimmung dieses Faktors werden mithilfe einer in der linearen Systemtheorie häufig verwendeten Methode, der Frequenzganganalyse, Zeitkonstanten der Cl^--Pumpe direkt gemessen. Damit lassen sich dann die Geschwindigkeitskonstanten aus der Analyse der stationären Eigenschaften normieren. Im zweiten Teil der Arbeit wird das zeitabhängige Verhalten der ECP beschrieben und analysiert und damit die rein stationäre Analyse der IU-Kurven wesentlich erweitert. In der sich daran anschliessenden Diskussion der elektrogenen Cl^--Pumpe kann erstmals eine experimentell untermauerte reaktionskinetische Beschreibung einer elektrogenen Pumpe gegeben

werden. Diese Beschreibung ist ohne prinzipielle Schwierigkeiten auf andere Transportsysteme übertragbar.

2.3 Theorie

In diesem Abschnitt werden die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendigen reaktionskinetischen Modelle eingeführt und deren mathematische Behandlung erläutert. Ausführliche Herleitungen und Beschreibungen der Modelle sind bei Hansen et al. 1981, Gradmann et al. 1982a und Hansen et al. 1983 zu finden.

2.3.1 Das 6-Zustandsmodell

Abbildung 1 zeigt ein reaktionskinetisches Modell für die elektrogene Cl^--Pumpe von Acetabularia, das die augenblickliche Arbeitshypothese darstellt (Mummert et al. 1981).

Das 6-Zustandsmodell ist gekennzeichnet durch 6 Zustände des Carriers X_i mit den jeweiligen Dichten N_i und 6 reversiblen Reaktionen mit den dazugehörigen Geschwindigkeitskonstanten k_{ij}. Die Geschwindigkeitskonstanten, die die Bindung eines Substrats an den Carrier beschreiben, enthalten die Konzentrationen der jeweiligen Substrate als Produkt mit den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten bei 1 M Substratkonzentration (siehe Gl. (10). Unter physiologischen Bedingungen pumpt der Carrier Cl^- in die Zelle. Beim Übergang des Carriers vom Zustand X_3 nach X_2 wird das Substrat (Cl^-) an der Außenseite der Membran gebunden. Darauf erfolgt die Translokation des Substratcarrierkomplexes über die Membran (X_2 nach X_1). Dieser Schritt ist

spannungsabhängig, da der Komplex als negativ geladenes Ion im elektischen Feld der Membran bewegt werden muß. Auf der Innenseite wird der Komplex dephosphoryliert. Dieser Vorgang ist durch den Übergang von X_1 nach X_6 beschrieben. Die hierbei freiwerdende Energie drückt sich im Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten k_{16} und k_{61} aus. Nach der Dephosphorylierung entlädt der Carrier sein Substrat (X_6 nach X_5) und wird phosphoryliert. Darauf erfolgt die Translokation des unbeladenen Carriers zur Außenseite der Membran (X_4 nach X_3) und der Zyklus kann von Neuem beginnen.

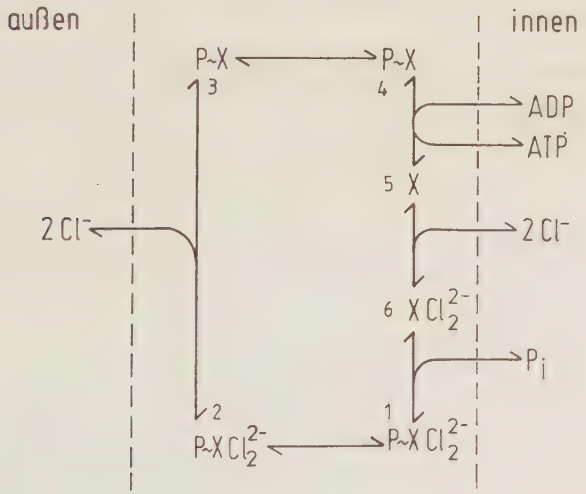

Abbildung 1
Das Modell der ECP mit 6 Zuständen X_i und 6 reversiblen Reaktionen mit den dazugehörigen 12 Geschwindigkeitskonstanten k_{ij}.

Dieser Transportzyklus weist folgende Eigenschaften auf:

- Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Carriers finden an der Innenseite der Membran statt.

- Der Transport von Cl^- über die Membran erfolgt mit der Stöchiometrie von $2Cl^-$ pro Zyklus.

- Der Reaktionsschritt von X_1 nach X_2, bzw. X_2 nach X_1 ist spannungsabhängig, da der geladene Carrierkomplex im elektrischen Feld der Membran bewegt wird.

- Die Phosphorylierung bleibt fast den ganzen Zyklus über bestehen. Ein ähnliches Verhalten findet man bei der Na-K-ATPase (Karlish et al. 1978).

Dieses Modell läßt sich nun in folgenden Differentialgleichungen formulieren:

$$\frac{dN_1}{dt} = -(k_{12}+k_{13})N_1 + k_{21}N_2 + k_{31}N_3$$

$$\frac{dN_2}{dt} = k_{12}N_1 - (k_{21}+k_{24})N_2 + k_{42}N_4$$

$$\frac{dN_3}{dt} = k_{13}N_3 - (k_{31}+k_{34}+k_{35})N_3 + k_{43}N_4 + k_{53}N_5$$

$$\frac{dN_4}{dt} = k_{24}N_2 + k_{34}N_3 - (k_{42}+k_{43}+k_{46})N_4 + k_{64}N_6 \quad 2\,a,f$$

$$\frac{dN_5}{dt} = k_{35}N_3 - (k_{53}+k_{56})N_5 + k_{65}N_6$$

$$\frac{dN_6}{dt} = k_{46}N_4 + k_{56}N_5 - (k_{64}+k_{65})N_6$$

Zunächst soll das stationäre Verhalten beschrieben werden, das bedeutet $\frac{dN_i}{dt} = 0$ für i= 1 bis 6. Mit der Zusatzannahme $\Sigma N_i = N$ = konstant (Gestz der Massenerhaltung) im

Zeitbereich eines Transportzyklus (etwa 10 msec) läßt sich das Gleichungssystem (2) bei bekanntem N nach N_i lösen.

Interessant ist im Rahmen dieser Arbeit der Strom, der durch dieses System transportiert werden kann. Für die Flußdichte Φ (mol Teilchen m^{-2} s^{-1}) von außen nach innen, bzw. innen nach außen gilt:

$$\Phi_{12} = k_{12} N_1 \text{ , bzw. } \Phi_{21} = k_{21} N_2 \qquad 3\,a,b$$

Netto wird die Differenz $\Phi_{12} - \Phi_{21}$ fließen. Aus diesem Nettofluß erhält man den elektrischen Strom, indem der Fluß mit der Faradaykonstanten F und der Ladungszahl z multipliziert wird:

$$i = zF (k_{12}N_1 - k_{21}N_2) \qquad 4$$

Die Spannungsabhängigkeit verbirgt sich in den beiden Geschwindigkeitskonstanten k_{12} bzw. k_{21}, die den Ladungstransport beschreiben.

Dabei gilt für eine symmetrische Eyring-Barriere (nach Läuger und Stark 1970):

$$k_{12}=k^o_{12} \exp (zu/2), \text{ bzw. } k_{21}=k^o_{21} \exp (-zu/2) \qquad 5\,a,b$$

mit

z = Ladungszahl

u = normalisierte Membranspannung, für die gilt:

$u = V_m F/RT$

V_m = Membranspannung = $\Delta \Psi$ = Differenz zwischen dem elektrischen Potential im Innern und im Außenmedium

k^o_{ij} = Geschwindigkeitskonstante bei der Spannung u = 0

F, R, T haben ihre übliche thermodynamische Bedeutung

Der Faktor 1/2 bzw. -1/2 in den Gleichungen (5a,b) charakterisiert den den Potentialverlauf $\Psi(x)$ über der Membran (vgl. Abbildung 2) für den einfachen Fall, daß das Potentialmaximum in der Mitte der Membran liegt. Dieser Faktor wird im Folgenden als räumlich und zeitlich fest angenommen. Diese Verhältnisse sind in Abbildung 2 illustriert.

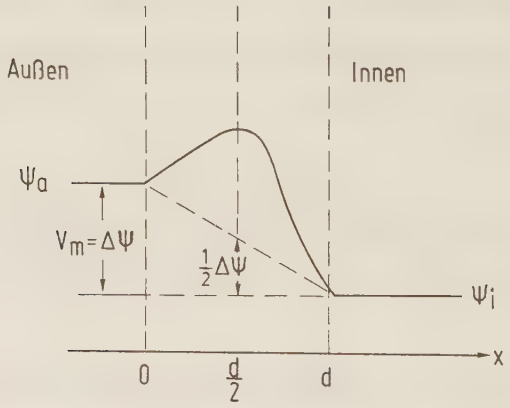

Abbildung 2
Potentialverlauf $\Psi(x)$ über der Membran. Die Dicke der Membran sei d. Die Potentialdifferenz in der Mitte der Membran sei $\Delta\Psi/2$. Die Potentialdifferenz $\Delta\Psi$ zwischen Innen und Außen ist die Membranspannung V_m.

Die einzelnen Größen des 6-Zustandsmodells sind experimentell sehr schwierig zu fassen. Dem Experimentator stellt sich das sogenannte "inverse Problem", aus ermittelten Eigenschaften ein Reaktionsmodell zu entwerfen, das die Resultate befriedigend beschreibt. Für das 6-Zustandsmodell

müßte man 12 Geschwindigkeitskonstanten messen und dann noch deren korrekte Anordnung bestimmen.

Der Ausweg, den man üblicherweise einschlägt, kann unter dem Begriff "extended kinetics" zusammengefaßt werden. Darunter versteht man die Erweiterung der Untersuchung des kinetischen Verhaltens des Gesamtsystems bei definiert veränderten Bedingungen. In dem Fall der ECP entspricht dies etwa dem Einfluß variierter Cl^--Außenkonzentration und/oder Membranspannung auf den gemessenen Ladungstransport oder auch der Abhängigkeit des Ladungstransports von der ATP Konzentration im Zellinnern.

Wie gezeigt wurde (Gradmann et al. 1982a) kann aus einer IU-Kurve eines class-I-models (siehe unten) vier Parameter bestimmt werden, aus einer weiteren IU-Kurve bei einer veränderten Bedingung weitere vier Parameter, die zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten benützt werden können. Bei den vier Parametern handelt es sich um die beiden Sättigungsströme, das thermodynamische Gleichgewicht und die Steigung einer IU-Kurve.

Eine entscheidende Hilfe bei der Analyse von Transportsystemen bieten sogenannte Reduktionsmodelle (Hansen et al. 1982). Dabei wird formal die Anzahl der Carrierzustände soweit reduziert, daß die gemessenen Werte mit dem einfachst möglichen Modell korrekt beschrieben werden können. So erwies sich zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit des Stroms durch Transportsysteme mit einem ladungstransportierendem Schritt (class-I-models) ein 2-Zustandsmodell als

ausreichend (Gradmann et al. 1982a, Hansen et al. 1981). Zur Beschreibung der Substratabhängigkeit von IU-Kurven genügt ein 3-Zustandsmodell (Hansen et al. 1982). Die kinetischen Größen der Reduktionsmodelle (Geschwindigkeitskonstanten und Konzentrationen) müssen jedoch mit sogenannten Reservefaktoren versehen werden, um der veränderten Anzahl der Zustände im Modell Rechnung zu tragen. Diese Reservefaktoren begründen dann aber das "Recht auf das bequemste Modell" (Hansen et al. 1982). Das 3- und 2-Zustandsmodell wird in den nächsten beiden Abschnitten beschrieben.

2.3.2 Das 3-Zustandsmodell

Im 3-Zustandsmodell werden die Reaktionen der Entladung des Carriers an der Innenseite der Membran und der Phosphorylierung, sowie die Translokation des unbeladenen Carriers zu einer reversiblen Reaktion zusammengefaßt. Die Geschwindigkeitskonstanten solcher zusammengefaßter Reaktionen werden häufig mit "κ" symbolisiert (Hansen et al. 1981, Gradmann et al. 1982a, vgl.auch 2.3.3). Aus typographischen Gründen werden hier auch zusammengefaßte Reaktionen mit "k" bezeichnet, ohne daß dadurch die Gültigkeit der gemachten Aussagen beeinflußt wird.

Die Dephosphorylierung des Carriers an der Innenseite ist im spannungsabhängigen Reaktionsschritt enthalten, da sie eine sehr schnelle Reaktion ist und dadurch mit der unmittelbar vorhergehenden, langsamen Translokation des Carrier-Substrat-Komplexes verschmilzt (Gradmann et al. 1982a). Die Geschwindigkeitskonstanten k_{cb} bzw. k_{bc}

beschreiben Assoziation bzw. Dissoziation des Substrats an der Außenseite der Membran. In Abbildung 3 ist das 3-Zustandsmodell zusammengefaßt.

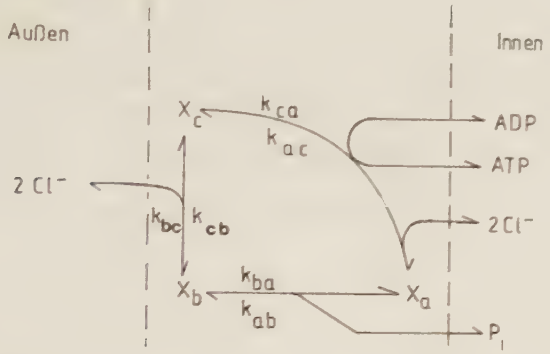

Abbildung 3
Das 3-Zustandsmodell der ECP. Die Phosphorylierung des Carriers, Abgabe von Cl^- an der Innenseite, sowie Rücktransport des unbeladenen Komplexes wurden in den Geschwindigkeitskonstanten k_{ac} bzw k_{ca} zusammengefaßt.

Die Anzahl der Carrierzustände wurde von 6 auf 3 reduziert. Damit stimmen die Geschwindigkeitskonstanten des 3-Zustandmodells mit denen des 6-Zustandmodells nicht mehr überein. Dafür stehen geänderte Indizes a,b,c bei den Zuständen und Geschwindigkeitskonstanten des 3 Zustandsmodells. Den Zusammenhang mit den Geschwindigkeitskonstanten des 6 Zustandsmodells vermitteln die sogenannten Reservefaktoren r_i. Dabei gilt:

$$k_{ab}=k_{12}/r_a,\ k_{ac}=k_{13}/r_a,\ k_{cb}=k_{32}/r_c,\ k_{ca}=k_{31}/r_c,\ k_{bc}=k_{23},\ k_{ba}=k_{21} \qquad 6a,$$

Die von Zustand X_b ausgehenden Geschwindigkeitskonstanten k_{bc} und k_{ba} entsprechen denen des 6 Zustandsmodells (k_{32} und

k_{21}), da die getroffene Reduktion von 6 auf 3 Zustände den Zustand X_2 nicht beeinflußt.

Für den stationären Fall wird das 3-Zustandsmodell explizit gelöst. Dazu werden entsprechend dem Reaktionsschema (Abb. 3) folgende 3 Differentialgleichungen aufgeschrieben und aus diesen Gleichungen die Dichten N_a, N_b und N_c bezogen auf die Gesamtdichte N bestimmt.

$$\frac{dN_a}{dt} = -(k_{ab}+k_{ac})N_a + k_{ba}N_b + k_{ca}N_c = 0$$

$$\frac{dN_b}{dt} = k_{ab}N_a - (k_{ba}+k_{bc})N_b + k_{cb}N_c = 0 \qquad 7a,c$$

$$\frac{dN_c}{dt} = k_{ac}N_a + k_{bc}N_b - (k_{ca}+k_{cb})N_c = 0$$

$$N_a = \frac{k_{ba}(k_{cb}+k_{ca}) + k_{bc}k_{ca}}{k_{ab}(k_{bc}+k_{cb}+k_{ca})+k_{ac}(k_{ba}+k_{bc}+k_{cb})+k_{ba}(k_{ca}+k_{cb})+k_{ca}k_{bc}} N$$

$$N_b = \frac{k_{ab}(k_{cb}+k_{ca}) + k_{ac}k_{cb}}{k_{ab}(k_{bc}+k_{cb}+k_{ca})+k_{ac}(k_{ba}+k_{bc}+k_{cb})+k_{ba}(k_{ca}+k_{cb})+k_{ca}k_{bc}} N \qquad 8a,c$$

$$N_c = N - N_a - N_b$$

Der Strom, der in diesem System fließt, ist dann die Differenz zwischen dem Auswärtsstrom $zFk_{ab}N_a$ und dem Einwärtsstrom $zFk_{ba}N_b$. Die Ladungszahl z berücksichtigt die Anzahl der Ladungen pro Transportschritt. Damit wird mit Gl (8a,b), 6(a,f) der stationäre Strom in diesem System:

$$i = zFN \frac{k_{ab}k_{bc}k_{ca} - k_{ba}k_{ac}k_{cb}}{k_{ab}(k_{bc}+k_{cb}+k_{ca})+k_{ac}(k_{ba}+k_{bc}+k_{cb})+k_{ba}(k_{ca}+k_{cb})+k_{ca}k_{bc}} \qquad 9$$

Die Abhängigkeit von k_{cb} von der äußeren Cl^- -Konzentration Cl^-_o ist gegeben durch:

$$k_{cb} = \overline{k_{cb}} \quad (Cl^-)^2 \qquad 10$$

Dabei ist $\overline{k_{cb}}$ die Geschwindigkeitskonstante bei 1M Cl^-. Es wird also erwartet, daß mit sinkender Cl^- Konzentration die Geschwindigkeitskonstante k_{cb} kleiner wird. Da aus früheren Versuchen eine Stöchiometrie von $2Cl^-$ pro Transportzyklus bekannt ist (Gradmann 1975, Mummert et al. 1981), wird hierfür eine quadratische Abhängigkeit erwartet (vgl. Gl. (9)).

2.3.3 Das 2-Zustandsmodell

Im 2-Zustandsmodell wird die Cl^- Bindung bzw. Abgabe an der Außenseite nicht mehr als einzelne Reaktion beschrieben, da mit diesem Modell nur Spannungsabhängigkeiten untersucht werden. Es gibt jetzt nur noch zwei spannungsunabhängige Geschwindigkeitskonstanten κ_{io} bzw. κ_{oi} und zwei spannungsabhängige k_{oi} bzw k_{io}, die die Übergänge zwischen den beiden Zustände N_o und N_i beschreiben (vgl Abbildung 4).

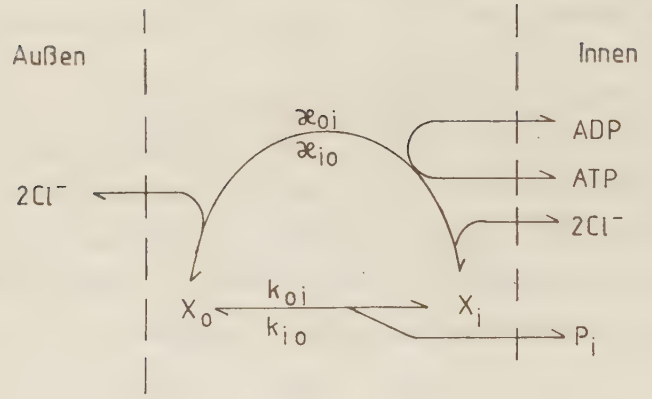

Abbildung 4
Das 2-Zustandsmodell der ECP mit den beiden spannungsunabhängigen Geschwindigkeitskonstanten κ_{io} und κ_{oi}, sowie den beiden spannungsabhängigen k_{io} und k_{oi}.

Wie gezeigt wurde (Gradmann et al. 1982a, Hansen et al. 1981) reicht ein solches Modell aus, um alle IU-Kurven von Systemen mit einem ladungstransportierenden Schritt ("class I models") zu beschreiben.

Im stationären Fall gilt:

$$\frac{dN_i}{dt} = \frac{dN_o}{dt} = 0 \qquad 11$$

dann folgt aus den entsprechenden Differentialgleichungen (vgl. Gl. (7a,c)) für das 2-Zustandsmodell mit der Annahme $N = N_i + N_o$ = konstant (Gesetz der Massenerhaltung) der Strom:

$$i = zFN \frac{k_{io}\kappa_{oi} - k_{oi}\kappa_{io}}{k_{io}+k_{oi}+\kappa_{io}+\kappa_{oi}} \qquad 12$$

Die Erweiterung auf nicht-stationäres Verhalten darf nun nicht von Gleichung (12), sondern muß von Gleichung (4) ausgehen (Hansen et al. 1983). Diese Gleichung muß noch mithilfe der Reservefaktoren r_1 und r_2 in eine Gleichung des realen 2 Zustandsmodells überführt werden:

$$r_1 = k_{12}/k_{io} \quad \text{bzw.} \quad r_2 = k_{21}/k_{oi} \qquad 13$$

Damit geht Gleichung (4) über in:

$$i = zF\,(r_1\, k_{io}\, N_1 - r_2\, k_{oi}\, N_2) \qquad 14$$

In dieser Gleichung sind N_1 und N_2, sowie die Größen k_{io} und k_{oi} spannungsabhängig (vgl. Gl. (5a,b) und (13a,b)). Diese Größen werden durch abgebrochene Reihenentwicklungen linearisiert, so daß die Gültigkeit der nachfolgenden Rechnung und Analyse gewährleistet ist (Hansen et al 83). Die elektrische Leitfähigkeit des Systems erhält man durch Ableitung von Gleichung (14) nach der Spannung:

$$\frac{\partial i}{\partial V_m} = \frac{z^2F^2}{2RT}\left(k_{io}r_1N_{1o} - k_{oi}r_2N_{2o} - zF\left(k_{io}r_1\frac{dN_1}{dV_m} - k_{oi}r_2\frac{dN_2}{dV_m}\right)\right) \qquad 15$$

N_{1o} bzw. N_{2o} sind die stationären Konzentrationen der Carrierzustände. Aus der Analyse eines 2-Zustandsmodells im stationären Fall folgt:

$$N_{1o} = \frac{k_{oi}+\kappa_{oi}}{r_1 K}N \quad \text{bzw.} \quad N_{2o} = \frac{k_{io}+\kappa_{io}}{r_2 K}N \qquad 16$$

$$\text{mit } K = k_{io} + k_{oi} + \kappa_{io} + \kappa_{oi} \qquad 17$$

Der Massenerhaltungssatz gilt auch hier:

$$r_1N_1 + r_2N_2 = N \qquad 18$$

daraus folgt:

$$r_1\frac{dN_1}{dV_m} = -\,r_2\frac{dN_2}{dV_m} \qquad 18'$$

Gleichungen (16) und (18) in (15) eingesetzt, ergeben die differentielle Leitfähigkeit des 2 Zustandsmodells:

$$\frac{di}{dV_m} = \frac{z^2F^2}{2RT} \frac{k_{io}(k_{oi}+\kappa_{oi})+k_{oi}(k_{io}+\kappa_{io})}{K} N - zF(k_{io}+k_{oi})r_2 \frac{dN_2}{dV_m} \qquad 19$$

Die Abhängigkeit von der Zeit erhält man nun ausgehend von den beiden Differentialgleichungen des 2-Zustandsmodells:

$$r_1 \frac{dN_1}{dt} = -(k_{12}+\kappa_{12}) N_1 + (k_{21}+\kappa_{21}) N_2$$

$$r_2 \frac{dN_2}{dt} = (k_{12}+\kappa_{12}) N_1 - (k_{21}+\kappa_{21}) N_2 \qquad 20a,b$$

Da dies ein gekoppeltes System ist (vgl Gleichung 18'), reicht die Betrachtung einer einzelnen Konzentration, z.B. N_2. Berücksichtigt man auch die Spannungsabhängigkeit, so geht Gleichung (20b) über in

$$\frac{d}{dV_m} \frac{d}{dt} r_2N_2 = \frac{1}{\tau}\left(r_2\frac{dN_{2\infty}}{dV_m} - r_2 \frac{dN_2}{dV_m} \right) \qquad 21$$

mit $\tau = 1/K$.

$N_{2\infty}$ ist die Konzentrationsänderung N_2 auf eine Spannungsänderung dV_m für $t \to \infty$ und ist somit eine stationäre Größe, für die gilt:

$$\frac{dr_2N_{2\infty}}{dv} = \frac{zF}{2RT} \frac{k_{io}(k_{oi}+\kappa_{oi})+k_{oi}(k_{io}+\kappa_{io})}{K^2} N \qquad 22$$

Aus den Gleichungen (21), (22) und (19) kann nun das zeitliche Verhalten berechnet werden. Da für die vorliegende Arbeit die Lösung für Sinusschwingungen benützt wird, ist

diese Lösung angegeben.

Es gilt (nach Milsum 1966):

$$\frac{\vec{dN_2}}{\vec{dV_m}} = \frac{1}{1+p\tau} \quad \frac{dN_{2\infty}}{dV_m} \qquad 23$$

mit p = 2*Pi*$\sqrt{-1}$*f, (f= Frequenz)

d.h. mit Hilfe der Laplace Transformation wird aus der Zeitebene in die Frequenzebene transformiert. Die Pfeile bedeuten, daß nun nicht mehr Konzentrationen, sondern komplexe Zahlen betrachtet werden. $\vec{dN2}$ bedeutet demnach die Änderung der Amplitude N_2 auf die sinusförmige Änderung der Spannung (Amplitude $\vec{dV}$, Frequenz f).

Damit kann man die Leitfähigkeit explizit angeben. Aus Gleichung (19),(21),(22),(23) folgt:

$$\vec{g} = \frac{\vec{di}}{\vec{dV}} = \frac{z^2F^2}{2RT} \quad \frac{k_{io}(k_{oi}+\kappa_{oi})+k_{oi}(k_{io}+\kappa_{io})}{K} \; N \; (1- \frac{k_{io}+k_{oi}}{K} \quad \frac{1}{1+p\tau}) \qquad 24$$

oder

$$\vec{g} = g_o \frac{1 + p\,/(\kappa_{io}+\kappa_{oi})}{1 + p\tau_n} \qquad 24'$$

mit

$$g_o = \frac{z^2F^2}{2RT} N \quad \frac{(k_{oi}(k_{io}+\kappa_{io})+k_{io}(k_{oi}+\kappa_{oi}))(\kappa_{io}+\kappa_{oi})}{K^2} \qquad 25$$

Die Impedanz $\vec{r}$ ist dann $1/\vec{g}$.

Damit ist der zeit- und spannungsabhängige Widerstand des 2-Zustands-modells analytisch angegeben. Auf Gleichung (24) wird bei der Analyse der Daten zurückgegriffen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Acetabularia mediteranea (A.m.) ist eine Grünalge aus der Ordnung Siphonales und gehört zur Familie der Dasycladaceae.

In Kultur wurden die Pflanzen in Erdschreibermedium gehalten, das alle 14 Tage gewechselt wurde (Keck 1964). Die Kulturen wurden in Klimaschränken bei 21° C und 12 Stunden Licht, 12 Stunden Dunkel gehalten.

Spätestens einen Tag vor den Messungen wurden die Zellen in natürliches oder künstliches Seewasser (KSW) überführt. Die Zusammensetzung des Seewassers ist wie folgt: 461 mM Na^+, 10 mM K^+, 53 mM Mg^{++}, 10 mM Ca^{++}, 529 mM Cl^-, 28 mM SO_4^{--}, 2 mM HCO_3^-, 10 mM Tris/HCl Puffer, pH 8.

Bei den Versuchen mit variierter Cl^- Konzentration wurde Cl^- durch I^- oder Benzolsulfonat ersetzt, bis die gewünschte Cl^- Konzentration erreicht war. I^- wurde gewählt, da aus Membranspannungsmessungen bekannt war, daß ein Ersatz von Cl^- im Außenmedium eine Depolarisierung um 80 mV hervorrief (Dieter 1980). Um auszuschließen, daß I^- unspezifischen Effekte an der Membran verursacht, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Cl^- durch ein weiteres Anion, Benzolsulfonat, ersetzt. Der Einfluß ionischer Effekte beim Ersatz von Cl^- wurde durch die Verwendung isotonischer Sorbitlösungen

überprüft. Von Sorbit ist bekannt, daß es nicht über biologische Membranen transportiert wird. Im Folgenden werden die Lösungen, in denen Cl^- teilweise durch I^-, Benzolsulfonat oder Sorbit ersetzt wird, als I^-, Benzolsufonat- bzw. Sorbitmedien bezeichnet.

Als Objekt für elektrophysiologische Untersuchungen bietet A. m. mehrere Vorteile:

- Der Zellschlauch besteht aus einer einzelnen Zelle, d.h. Komplikationen wie elektrische Kopplung an Nachbarzellen bestehen nicht.

- Der Durchmesser der Zelle beträgt ca 0,2 mm, die Länge der für Versuche verwendeten Zellen rund 30 mm. In diesem Stadium haben die Zellen noch keinen Hut entwickelt, auch ist die Versteifung der Zellwand noch im Anfangsstadium. Durch die Größe der Alge und deren elastische Zellwand ist der Anstich mit Mikroelektroden relativ einfach durchzuführen.

- Als Meerwasseralge lebt A.m. in einem natürlichen Medium der Osmolarität 1,1 Osmol. Ionenlösungen dieser Konzentration haben einen elektrischen Widerstand von ca. 10 Ohm cm, das heißt der Widerstand des Mediums um die Zelloberfläche ist gegenüber den Widerständen, die an der Zellmembran auftreten (>100 Ohm cm^2),zu vernachlässigen.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchsaufbau

Das Meßobjekt lag auf einem 10^{-4} m^2 großen Plexiglasblock, der in einer Kammer gefaßt war. Die Kammer (Größe 0,01×0,02×0,01 m) hatte 2 Öffnungen für Zu- und Ablauf von Medien. Die gesamte Meßkammer liegt auf dem Objekttisch eines Leitz Labolux II Mikroskops zur visuellen Kontrolle während des Einstichs. Die Beleuchtungsstärke (Weißlicht) am Ort des Objekts beträgt rund 1 W/m^2.

Die Messung der Membranspannung erfolgt mit der konventionellen Mikroelektrodentechnik.

3.2.2 Elektrischer Meßkreis

Abbildung 5 zeigt den Schaltkreis der Anordnung mit der die Messungen durchgeführt wurden. Es handelt sich dabei um einen sogenannten Voltage-clamp-Kreis, der von Tietze und Gradmann entwickelt wurde (Gradmann 1970).Das Meßprinzip der spannungsgeregelten Stromzufuhr (Spannungskompensation) geht ursprünglich auf Cole zurück (Übersicht bei Cole 1982). Das Meßprinzip sei im Folgenden erläutert.

Die Elektrode E_1 wird in die Zelle eingestochen und registriert eine Spannung gegenüber einer Referenzelektrode E_2 im Außenmedium. Die beiden Elektroden sind mit je einem Vorverstärker mit ca. 10^{12} Ohm Eingangswiderstand verbunden, die Spannungsmessung erfolgt differentiell.

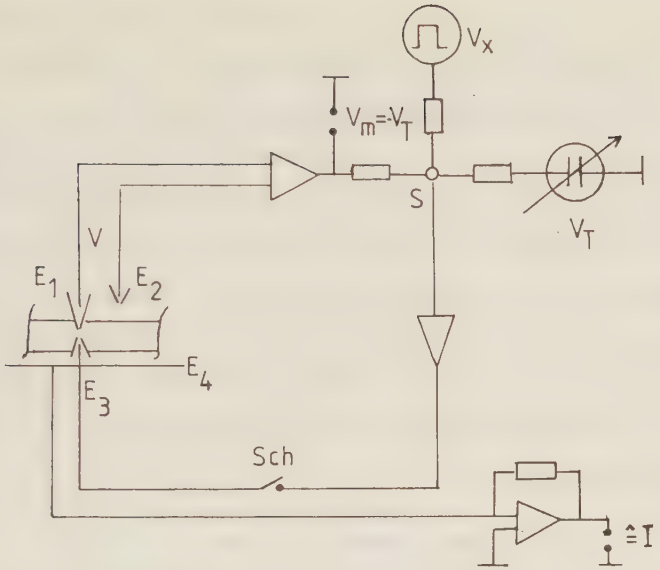

Abbildung 5
Schematische Darstellung des Schaltkreises. Die Elektroden E_1 und E_2 registrieren die Spannung V, die nach einem Operationsverstärker als Membranspannung V_m gegen Erde gemessen wird. Diese Spannung ist gleichzeitg auf den Summationspunkt S geführt, ebenso wie die Testspannung V_T und die Meßspannung V_x aus dem Funktionsgenerator. Wenn der Schalter Sch geschlossen ist, fließt solange Strom über die Elektrode E_3 in die Zelle, bis die Membranspannung $V_m = - V_T$ ist. Der Strom fließt über den Silberdraht E_4 ab und wird gemessen. Nähere Erläuterungen siehe Text

Der Ausgang dieses Vorverstärkers liefert einerseits die Membranspannung, die nun gegen Erde registriert wird und ist andererseits auf den Summationspunkt S geführt. Auf diesen Summationspunkt führt ebenfalls eine Testspannung V_T, die entgegengesetzt gepolt und über ein Potentiometer einstellbar ist. Je nach Testspannung herrscht am Summationspunkt eine Spannung, die über einen Operationsverstärker einen Strom erzeugt, der durch die Elektrode E_3 in

die Zelle geführt wird. Dieser Strom fließt solange, bis an der Membran die gegengleiche Spannung zu V_T herrscht. Der Strom wird im Außenmedium durch einen Silberdraht (E_4) gegen virtuelle Erde zur Strommessung über einen Operationsverstärker abgeführt. Dem Summationspunkt wurde zur Messung der IU-Kurven zusätzlich ein Rechtecksignal oder zu Impedanzmessungen eine Sinusschwingung aus einem Funktionsgenerator (Wavetek Modell 199) aufgesetzt (V_x). Die Amplituden der aufgesetzten Spannungssignale werden klein gehalten (<10 mV), um im linearen Bereich des Systemverhaltens zu bleiben (vgl. Abbildung 19).

Die Voltage-clamp Anordnung wird aus zwei Gründen gewählt:

- Zum einen zeigten frühere Messungen, daß die IU-Kennlinie der Plasmamembran N-förmig ist (Gradmann 1970). Dies bedeutet, daß zur eindeutigen Bestimmung dieser Charakteristik die Spannung vorgegeben werden muß und der dazu notwendige Strom gemessen wird.

- Zum anderen kann gezeigt werden, daß die Schnelligkeit des voltage-clamp Kreises nicht limitierend wird, wenn schnelle Änderungen der aufgesetzten Signale gemessen werden. Man muß lediglich den eingespeisten Strom messen.

3.2.3 Kabelprobleme

Eines der Hauptprobleme bei Strom-Spannungsmessungen bei Riesenzellen (Tintenfischaxon, zylinderförmige Algen wie

Nitella, Chara, Acetabularia) ist die sogenannte Kabeleigenschaft: Der Spannungsabfall $V = V_o \exp(-x/\lambda)$ längs der Zylinderachse (x) bei punktförmiger Stromeinspeisung am Punkt x=0, der durch das Verhältnis des Membranwiderstands r_m und des Längswiderstands r_i im Innern der Zelle gegeben ist. Daraus resultiert eine inhomogene Stromdichte über der Membran, d.h. die Eingangs-Strom-Spannungscharakteristik entspricht nicht der Strom-Spannungscharakteristik der Membran. Die Längskonstante wurde bei Acetabularia zu λ = 1,72 mm (Freudling et al. 1979) experimentell bestimmt, d.h. nach 1,72 mm ist die Spannung, die am Ort der Stromelektrode erzeugt wurde, auf 1/e abgefallen.

Dieses Problem wird nun so gelöst, daß aus dem Zylinder ein maximal 1mm langes Stück abgeschnürt wird. Die Algen werden dazu in zwei auf der Oberfläche von KSW schwimmende Haarschlingen (normales Kopfhaar) gelegt, die Schlingen festgezogen und die beiden Enden des Zellzylinders mit einer Schere abgeschnitten. Dieses Abschneiden dient zur nachträglichen Kontrolle im elektrischen Experiment anhand der Membranspannung, ob die Knoten elektrisch dicht sind und sich auch nicht während des Versuchs lockern. Etwa 20% aller "Kugeln" konnten mit zwei Mikroelektroden angestochen werden. Versuche konnten nur mit Kugeln durchgeführt werden, die am selben Tag präpariert wurden, in Ausnahmefällen gelang es, eine am Vortag präparierte Kugel anzustechen.

Die elektrischen Messungen an solchen Kugeln zeigten keine wesentlichen Unterschiede zu früheren Ergebnissen

(Gradmann 1975), die mit 3 Elektroden erhalten worden sind, so daß die Verwendung von Kugeln gerechtfertigt erscheint.

3.2.4 Registrierung und Auswertung der IU Kurven

Spannung und Strom wurden mit einem Zweikanallinienschreiber (Philips PM 8222) registriert. An Hand eines Beispiels (Abbildung 6) sollen die wichtigsten Punkte der Messung und Auswertung erklärt werden. Die Zelle zeigt eine Ruhespannung von -175 mV im Licht, der Clamp-Strom ist abgeschaltet. Auf "clamp-an" wird die Membranspannung auf -160 mV gelegt, dazu ist ein depolarisierender Strom notwendig, der zur Zeit t=0 (dies kann man mit dem Schreiber nicht messen) den Wert unendlich annimmt (im idealen Voltage-clamp) und für t → unendlich den stationären Wert I_∞ erreicht. Wenn dieser Wert erreicht ist, werden kleine Rechteckpulse V_x der Dauer 10 sec und der Amplitude ΔV= 8 mV überlagert. Durch Messung des Stromes ΔI, der auf die Rechteckpulse hin fließt, kann man die differentielle Leitfähigkeit dg bestimmen, gemäß dem Ohmschen Gesetz: $dg=\Delta I/\Delta V$.

Durch Wiederholung dieser Messungen bei verschiedenen Clamp-Spannungen im Bereich -250 mV < V_m < -90 mV kann die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Membranspannung erfasst werden. Durch numerische Integration gemäß $I=\int\Delta I=\int dg*\Delta V$ + konst kann dann der Strom berechnet werden und es ergibt sich dadurch eine IU Kurve. Die Integrationskonstante erhält man durch Bestimmung der elektromotorischen Kraft der Pumpe (s.u.). Die mit dem Schreiber mögliche

Zeitauflösung (>1Hz) gibt die Leitfähigkeit g_o der Pumpe mit hinreichender Genauigkeit an (Kontrolle mit dem Oszilloskop). Die Leitfähigkeit passiver Elemente sind in diesem Zeitbereich kleiner 5% (Gradmann 1975) und werden deshalb hier nicht berücksichtigt.

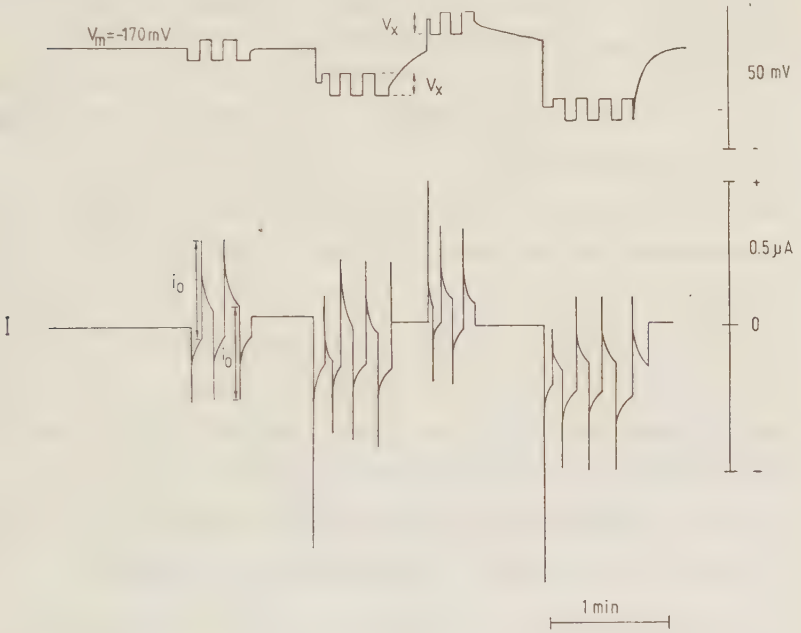

Abbildung 6
Zeichnung nach einer Originalregistrierung. Ausgehend von einer Membranspannung V_m = -170 mV, wird Vm auf $-V_m$ = -160 mV gelegt und der dazu notwendige Strom gemessen. Dann wird V_x (8 mV) eingeschaltet und die dazugehörige Stromantwort i_o gemessen. Aus dem Verhältnis i_o/V_x kann dann die Größe der differentiellen Leitfähigkeit bei der Spannung $-V_m$ angegeben werden. Durch Integration über einen Spannungsbereich von -250 mV bis -100 mV erhält man eine IU-Kurve.

Die Bestimmung der Oberfläche der abgeschnürten Segmente wurde mithilfe eines Okularmikrometers durchgeführt. Durch diese Oberflächenbestimmung konnten die gemessenen Ströme

dann normiert werden, es sind also Stromdichten angegeben.

Bei Auswertung der stationären IU-Kurven für t→ unendlich wird der Einfluß passiver Elemente größer, es wird deshalb dann auch von Membran IU-Kurven gesprochen. Die passiven Eigenschaften der Membran in diesem Zeitbereich waren ein Thema der Arbeit von Gradmann 1975.

3.2.5 Auswertung der gemessenen IU-Kurven mithilfe eines Rechnerprogramms

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten in Gleichung (6) werden diese Parameter solange verändert, bis die Abweichung zwischen den Werten der dann errechneten Funktion und den gemessenen Punkten minimalisiert ist. Das dazu verwendete Computerprogramm geht auf Lang und Müller zurück (Lang et al. 1972) und wurde von Herrn H. Hoffmann im Rechenzentrum des MPI für Biochemie in Martinsried auf einer VAX 11/320 eingerichtet. Es steht jetzt aber auch als BASIC Programm auf einem HP 85 Tischrechner zur Verfügung.

Wie im theoretischen Abschnitt bereits erwähnt wurde, sind zur Bestimmung der 6 Geschwindigkeitskonstanten 2 IU-Kurven notwendig. Die Schwierigkeit, daß aus einer IU Kurve nur 4 Parameter zu erhalten sind, wurde mithilfe eines sogenannten joined fit gelöst. Der Rechner mußte zwei gleiche Funktionen simultan anpassen, wobei er eine definierte Anzahl von Parametern von einer Funktion zur anderen konstant halten mußte. Auf diese Weise läßt sich ermitteln, welche Parameteränderung die beobachtete Änderung am besten beschreibt.

3.2.6 Registrierung und Auswertung der Frequenzgänge

Für die Frequenzganguntersuchungen wird die stationäre Clampspannung sinusförmig moduliert. Die Werte der stationären Membranspannung und des stationären Stroms werden auf dem Schreiber registriert, um eine Kontrolle über eventuelle Systemänderungen zu haben (wie z.B. unerwünschte Veränderung des stationären Stroms). Die Modulationssignale werden auf einem digitalen Speicheroszilloskop mit einer floppy-disk Speichereinheit (Nicolet Explorer 209B) festgehalten. In Abbildung 7 ist ein Beispiel einer solchen Aufzeichnung gegeben. Der untersuchte Frequenzbereich erstreckt sich von 1 Hz bis 10 kHz. Die niederfrequente Begrenzung wird gewählt, da der Zeitaufwand für Messungen bei niederen Frequenzen stark steigt und deshalb die Forderung nach konstantem Verhalten des Systems (gemessen am stationären Strom) nicht zu erfüllen wäre. Weiterhin scheint zwischen 1 Hz und 30 Hz der Widerstand frequenzunabhängig zu sein, so daß ein Abbrechen an diesem Punkt sinnvoll erscheint.

Die hochfrequente Grenze bei 10 kHz wird dadurch gegeben, daß bei höheren Frequenzen ein scheinbares Ansteigen des Widerstands beobachtet wird, das völlig spannungsunabhängig verläuft. Dies wird auf eine kapazitive Kopplung zwischen stromeinspeisender und spannungsmessender Elektrode zurückgeführt, denn dadurch wird die gemessene Spannung durch Einstreuung aus der Stromelektrode erhöht und damit ein höherer Widerstand vorgespiegelt. Dabei geht die Phasen-

verschiebung gegen Null, da die Phasendifferenz von zufliessendem Strom und registriertem Spannungsartefakt Null ist.In einigen Messungen wurden solche scheinbaren Anstiege des Widerstands bereits bei 6 kHz beobachtet. Diese Werte sind dann aber bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

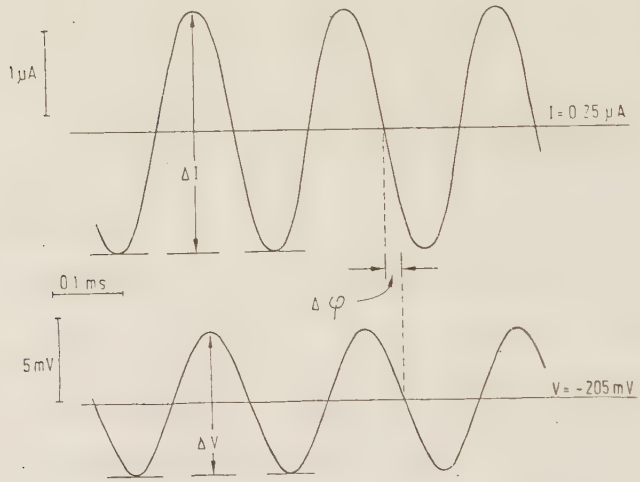

Abbildung 7
Darstellung einer Orginalaufzeichnung einer Impedanzmessung. Ausgewertet wird das Verhältnis $\Delta V / \Delta I$ und die Phasenverschiebung $\Delta\varphi$, sowie die Membranspannung, bei der gemessen wird.

Zur Auswertung wird das Verhältnis zwischen modulierter Membranspannung ΔV und Strom ΔI (siehe auch Abb.7) gebildet und die Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ bestimmt. Damit kann man den komplexen Wechselstromwiderstand angeben:

$$\vec{R} = |\vec{R}| * \exp(i\varphi) \qquad 26$$

Diese komplexe Zahl wird bei den jeweiligen Frequenzen dem Rechner eingegeben, der dann eine vorgewählte Übertragungsfunktion den gemessenen Werten anpaßt. Das Programm ist ein modifizierter Algorithmus nach Strobel 68 und wurde dankenswerterweise von Dr. U.-P. Hansen zur Verfügung gestellt.

3.2.7 Test der Methode durch einen Ersatzschaltkreis

Zum Test der Methode wurde ein Analogschaltkreis gebaut, der die zu erwartenden Eigenschaften der Membran simulieren soll. Es wurde hierzu der Schaltkreis in Abbildung 8 verwendet.

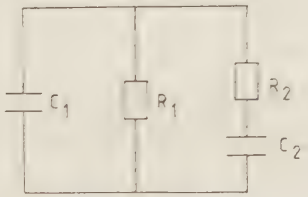

Abbildung 8
Ersatzschaltbild zum Test der Methode. Für $R_1 = R_2$ wurden 10 kOhm gewählt, C_1 = 10 nF und C_2 = 40 nF.

Die Meßpunkte und die errechnete Übertragungsfunktion nach dem oben erwähnten Programm sind in Abbildung 9 wiedergegeben.

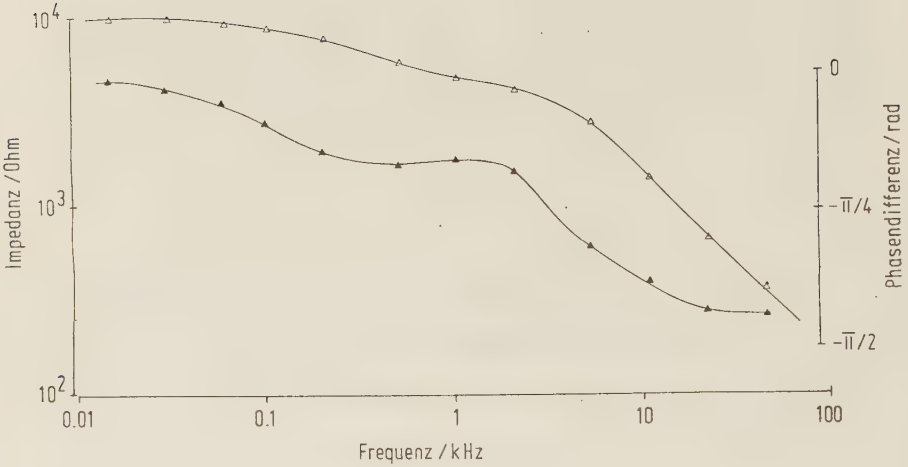

Abbildung 9
Bode-Diagramm des Ersatzschaltbildes aus Abbildung 8. Die Symbole (▲ für die Phase und △ für die Amplitude) zeigen die Meßwerte, die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Computernäherung.

Die Analyse der Übertragungsfunktion ergab folgende Werte für die einzelnen Größen des elektrischen Schaltkreises:

$$C_1 = 10{,}1 \text{ nF} \;,\; C_2 = 36{,}9 \text{ nF}$$

$$R_1 = 9{,}5 \text{ kOhm} \;,\; R_2 = 8{,}6 \text{ kOhm}$$

Damit liegen die Abweichungen durchweg unter 10%, eine Genauigkeit, die innerhalb der Toleranzgrenzen der Bauelemente des Ersatzschaltkreises liegt. Es wird deshalb die Methode für hinreichend tauglich erachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluß der Cl^- Konzentration auf die Stromspannungscharakteristik

4.1.1 Messung der elektromotorischen Kraft der Pumpe

Wie in Kapitel 3.2.4 bereits beschrieben, benötigt man zur Berechnung der IU-Kurve die elektromotorische Kraft E_p der Pumpe zur Bestimmung der Integrationskonstanten.

Dazu werden die IU-Kurven der Membran im Licht und im Dunkel bei Spannungen < -150 mV aufgenommen. Der Spannungswert des Schnittpunkts der beiden IU-Kurven ergibt dann die elektromotorische Kraft E_p der Pumpe (Gradmann 1975). Meßtechnisch erwies sich diese E_p Bestimmung als schwierig, da das Abschalten des Lichts ein Aktionspotential auslöst (Gradmann 1971), dessen Erholungsphase mehr als 10 Minuten dauern kann.

In KSW wurde ein E_p von -(190 ± 0,66) mV aus N=5 Messungen (Mittelwert ± Standardfehler) bestimmt. Dies stimmt mit früheren Messungen (-189 mV) überein (Gradmann 1975). In Tabelle 1 ist die Abhängigkeit von E_p von der Cl^- Konzentration angegeben. Bei einer Konzentration von 449 mM Cl^- im Außenmedium wurde E_p zu -(184 ± 1,44)mV mit N=6 gemessen, bei 310 mM Cl^- ergab sich E_p zu -(175 ± 2,1) mV aus N=5 Messungen. Bei 170 mM Cl^- liegt leider nur eine

Messung vor mit E_p = -163 mV. Die Änderung von E_p bei variierter Cl^- Konzentration kann man nach folgender Formel berechnen:

$$\Delta E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]'_o}{[Cl^-]_o} \qquad 27$$

$[Cl^-]'_o$ ist die variierte Außenkonzentration, verglichen mit der des Kontrollmediums (KSW) $[Cl^-]_o$.

Konzentration	529	459	310	170
Medium				
Benzolsulfonat		-185	-172	
-"-		-179	-174	-163
-"-		-186	-172	
-"-		-181		
-"-		-188		
Jodid	-190	-182	-183	
Sorbit			-172	
KSW	-190			
KSW	-191			
KSW	-192			
KSW	-190			
KSW	-188			
Mittelwerte	-190,2	-183,5	-174,6	-163
Standardfehler	+ 0,66	+ 1,38	+ 2,14	
errechneter Wert	-190	-185	-176	-160

Tabelle 1
Die elektromotorische Kraft der Pumpe E_p (in mV) bei verschiedenen Cl^- Außenkonzentrationen (mM). Der errechnete Wert folgt aus Gleichung (27).

Die Abweichungen zwischen gemessenen und errechneten Werten sind durchweg kleiner als 2% (vgl. Tabelle 1). Ein unterschiedlicher Einfluß der Ersatzmedien auf E_p kann nicht festgestellt werden. Es erscheint deshalb als gerecht-

fertigt, diese errechneten Werte für E_p zur Bestimmung der Integrationskonstanten zu verwenden.

4.1.2 Messung der Strom-Spannungskurven

Die Strom-Spannungskurven bei vier verschiedenen Cl^- Konzentrationen sind in Abbildung 10 und 11 dargestellt. Dabei wurde als Ersatzion Benzolsulfonat (Abb. 10) oder Jodid (Abb. 11) verwendet. Auf den ersten Blick erkennt man drei Veränderungen:

- betragsmäßig kleinere Sättigungsströme i_{sat} bei kleineren Cl^--Konzentrationen

- geringere absolute Steigung, d.h. Leitfähigkeit mit kleineren Cl^- – Konzentrationen. Unter absoluter Leitfähigkeit q_{pmax} wird in diesem Zusammenhang die maximale Steigung der IU-Kurve verstanden. Zur Bestimmung dieser Größe wird der entsprechende Abschnitt der IU-Kurve als linear angesehen. In Abbildung 13 A ist q_{pmax} als Funktion der Cl^- Konzentration aufgetragen.

- Werden die Leitfähigkeiten aber auf die Sättigungswerte der IU-Kurven bezogen, so kann man von relativen Leitfähigkeiten sprechen. Diese kann man charakterisieren durch die Spannung, nach der der halbmaximale Strom erreicht wird (HSW). Auch diese relativen Leitfähigkeiten werden mit fallender Cl^--Konzentration geringer (vgl. Abb. 13 B).

Die Unterscheidung zwischen relativer und absoluter

Leitfähigkeit wird deshalb eingeführt, da beide Größen wie weiter unten zu sehen ist, auf unterschiedliche Aussagen führen. Diese Auswertung des HSW ist jedoch nur möglich, wenn die IU-Kurve bis zu den Sättigungswerten angegeben werden kann.

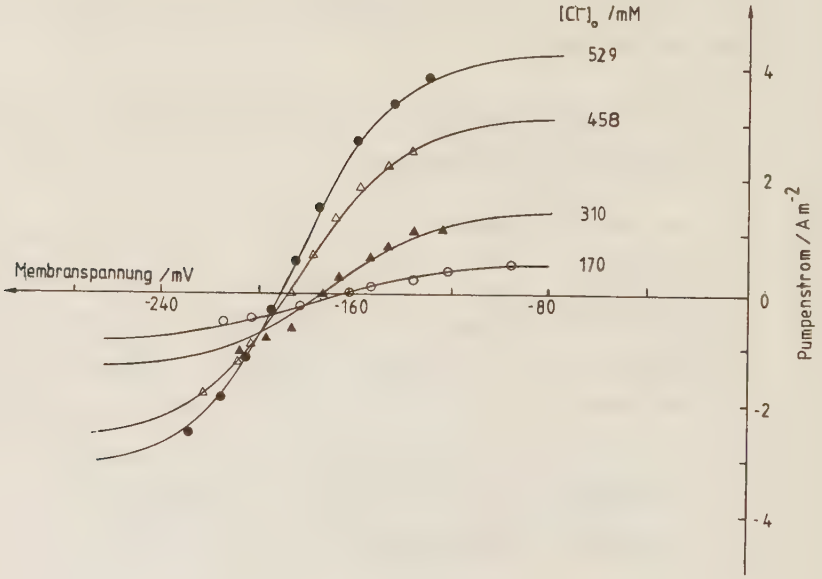

Abbildung 10
IU-Kurven der ECP in 4 verschiedenen Cl^- Außenkonzentrationen. Als Austauschion für Cl^- wurde Benzolsulfonat verwendet. Die durchgezogenen Linien sind das Ergebnis einer Kurvenanpassung, die Meßwerte sind durch die Symbole markiert.

Festzuhalten ist ferner, daß zwischen den beiden Austauschmedien (I^- und Bezolsulfonat) kein Unterschied

festzustellen ist, obwohl beide chemisch doch recht verschieden sind. Es wird daraus geschlossen, daß das ausgetauschte Ion keinen Einfluß auf die Kennlinie hat.

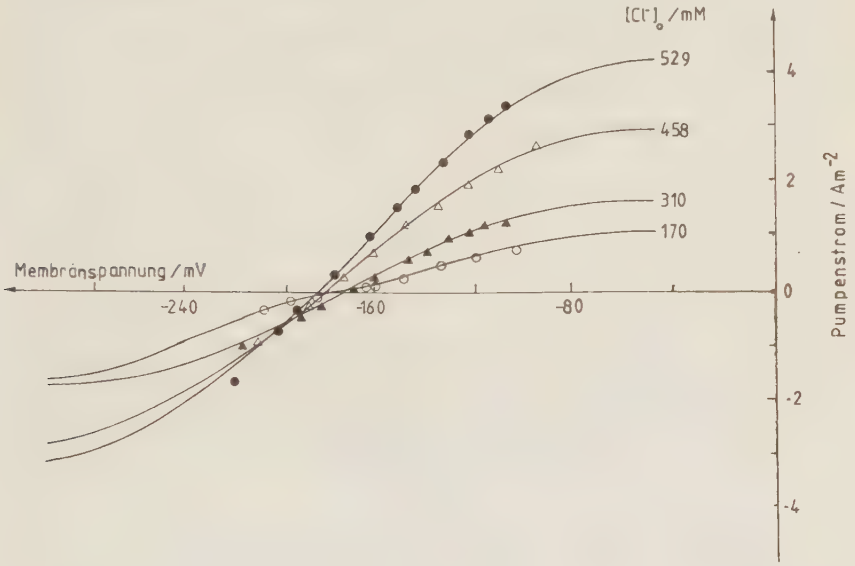

Abbildung 11
IU-Kurven der ECP in 4 verschiedenen Cl^- — Außenkonzentrationen. Als Austauschion für Cl^- wurde I^- verwendet. Nähere Erläuterungen siehe Abbildung 10.

Anders sieht jedoch die Charakteristik aus, wenn durch Zugabe isotonischer Sorbit-Lösung die Cl^- Konzentration erniedrigt wird (Abbildung 12):

- Die Sättigungsströme steigen mit fallender Cl^- Konzentration.

- Die absoluten Leitfähigkeiten steigen mit sinkender Cl^- Konzentration.

- Die relative Leitfähigkeit fällt jedoch ebenfalls mit sinkender Cl^--Konzentration (Abb. 13b). Die ermittelten Daten für die absolute Leitfähigkeit g_p und die relative (HSW) bei verschiedenen Cl^--Konzentrationen sind der Abbildung 13 zu entnehmen.

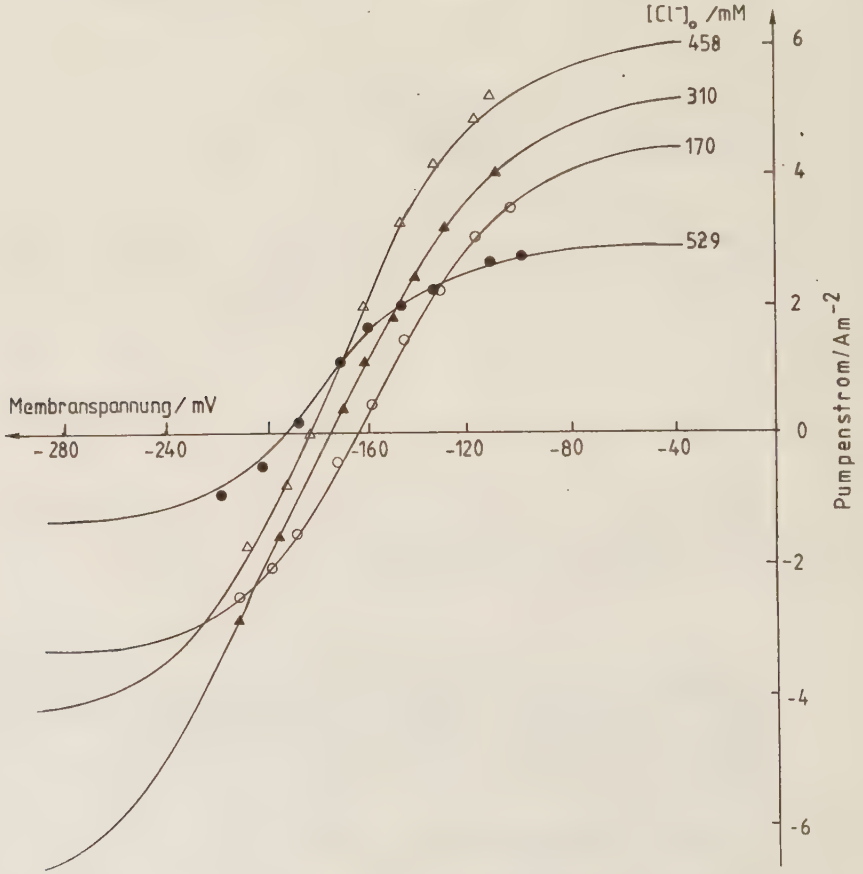

Abbildung 12
IU-Kurven der ECP in 4 verschiedenen Cl^--Konzentrationen. KSW wurde mit isotonischer Sorbit-Lösung verdünnt. Nähere Erläuterungen siehe Abbildung 10.

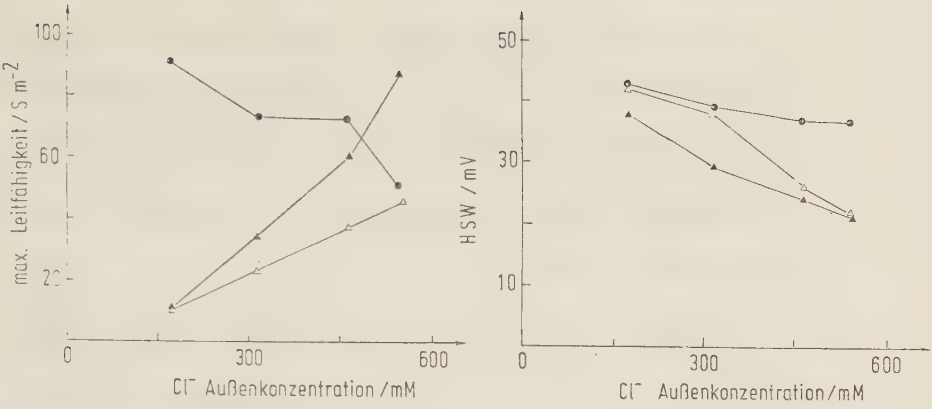

Abbildung 13
Absolute (g_{pmax}) und relative Leitfähigkeit (HSW) in Abhängigkeit von der Cl^--Konzentration. Man erkennt das gleichartige Verhalten wenn der HSW betrachtet wird (B), während bei Auswertung von g_{pmax} die Ergebnisse der Sorbitlösungen (●) zu anderen Werten führen als die der Jodid (△) und Benzolsulfonat (▲) IU-Kurven.

Diese Aussagen sind für eine numerische Analyse des Transportmechanismus nicht hinreichend, vor allem weil nicht in allen Fällen bis zum eindeutigen Erreichen des Sättigungsstroms gemessen werden konnte. Es wurde daher eine mathematische Annäherung nach dem genannten Programm durchgeführt, bei der nach Gleichung (9) die gemessenen IU-Kurven in Parameter der reaktionskinetischen Analyse (Geschwindigkeitskonstanten k_{ij} und Veränderung der Carrierdichte N) überführt werden. Für diese Berechnung wurden von den sieben Parametern (vgl. Abb. 3) je zwei zur Variation freigegeben, da mit einem variierten Parameter allein keine befriedigenden Anpassungen erreicht werden

konnten.

Zur Interpretation wurde unter allen möglichen Ergebnissen nach denen mit den besten Kurvenanpassungen gesucht, d.h. es wurden diejenigen Anpassungen ausgewählt, bei denen nach berechneter Variation zweier Parameter die Abweichungen zwischen Meßwerten und gerechneter Kurve minimalisiert sind.

In Tabelle 2 sind die jeweils besten drei Kurvenanpassungen angegeben, die Angaben für die jeweiligen Austauschmedien sind getrennt aufgelistet. Während bei den IU-Kurven in Sorbitlösungen die besten Anpassungen erreicht wurden, wenn k_{cb} und N variiert wurden, gilt dies für Jodid und Benzolsulfonat nur mit Einschränkungen, denn hier erreichten Anpassungen mit veränderten k_{cb} und k_{ac} vergleichbar gute Beschreibungen.

Benzolsulfonat

veränderte Parameter	Rang 1	2	3
k_{bc}, N	1		4
k_{cb}, N	3	5	2
k_{cb}, k_{ca}	3	5	4
k_{ca}, k_{ac}	1		
k_{ab}, k_{ca}	1		
k_{ab}, N	1		
k_{cb}, k_{ac}	2		

Jodid

veränderte Parameter	Rang 1	2	3
k_{bc}, N	1	2	2
k_{cb}, N	2	5	5
k_{cb}, k_{ca}	5	2	2
k_{cb}, k_{ac}	1		
k_{ab}, N	1	1	1
k_{ac}, N	1	1	1

Sorbit

veränderte Parameter	Rang 1	2	3
k_{bc}, N	1	7	1
k_{cb}, N	9	2	
k_{cb}, k_{ca}	1	7	1

Tabelle 2
Ergebnis der jeweils drei besten Kurvenanpassungen. Angegeben sind die Parameter, die verändert wurden und in derselben Zeile, wie oft diese Veränderung zu einer der drei besten Anpassungen führte.

Insgesamt ergibt die Variation von k_{cb} und N insgesamt 33 mal eine der drei besten Anpassungen, mit k_{cb} und k_{ac} als veränderten Parametern "nur" 25 mal. Alle anderen Kombinationsmöglichkeiten ergeben zwar mathematische Lösungen, werden aber im weiteren nicht betrachtet, da sie zum einen aus rein statistischen Gründen unwahrscheinlicher sind, zum andern keine einfache kinetische Erklärung haben. Die weitere Analyse wird auf die Veränderung k_{cb} und N beschränkt. Auf die etwas schlechtere Alternative mit den veränderten k_{cb} und k_{ac} wird in der Diskussion eingegangen.

In Tabelle 3 sind die Resultate der Auswahl nach Tabelle 2 zusammengefaßt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler der Veränderungen der beiden Parameter k_{cb} und N um die jeweiligen Faktoren. Die Zahl in Klammern bezieht sich auf die Anzahl der Messungen. Die Werte der Kontrollkurve wurden eins gesetzt.

Medium	veränderte Parameter	Cl^- Konzentration 459	310	170
Sorbit	k'_{cb}/k_{cb}	0,56 + 0,04 (3)	0,31 + 0,03 (7)	0,18 + 0,03 (2)
	N'/N	1,40 + 0,33	1,09 + 0,13	1,27 + 0,35
Jodid	k'_{cb}/k_{cb}	0,40 + 0,05 (4)	0,22 + 0,04 (5)	0,14 + 0,04 (3)
	N'/N	0,25 + 0,11	0,34 + 0,04	0,35 + 0,08
Benzol-sulfonat	k'_{cb}/k_{cb}	0,68 + 0,04 (4)	0,31 + 0,02 (6)	0,14 + 0,01 (3)
	N'/N	0,72 + 0,08	0,52 + 0,07	0,29 + 0,10
Hydrogen-karbonat	k'_{cb}/k_{cb}		0,24	
	N'/N		0,76	

Tabelle 3
Ergebnis der Auswahl der besten Kurvenanpassungen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameteränderungen bei den jeweiligen Konzentrationen. k_{cb} ist die Geschwindigkeitskonstante k_{cb} bei veränderter Konzentration.

Die Werte dieser Tabelle lassen sich so zusammenfassen: In allen Medien wird k_{cb} mit sinkender Cl^--Außenkonzentration kleiner, die Abhängigkeit ist deutlich nicht linear. Veranschaulicht wird dies in Abbildung 14, in der k_{cb} gegen die Cl^--Außenkonzentration aufgetragen ist.

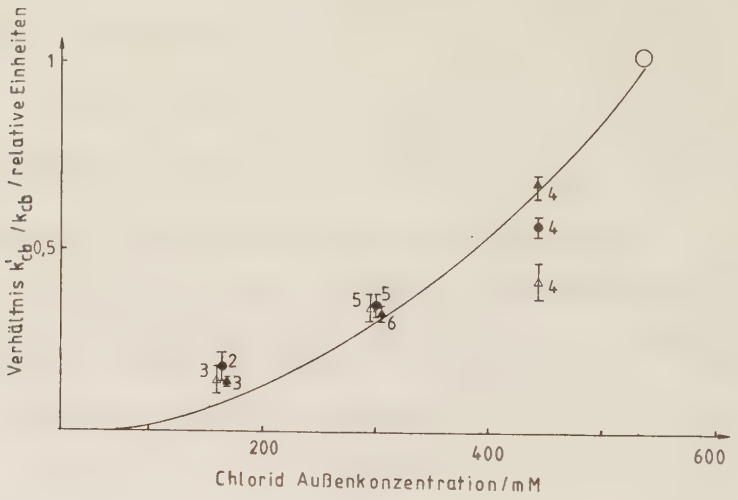

Abbildung 14
Veränderung des Parameters k_{cb} in Abhängigkeit von der Cl^- Außenkonzentration. Eingezeichnet sind die Werte der Tabelle 3. Die Symbole stehen für die verwendeten Ersatzmedien: (●) Sorbit, (▲) Benzolsulfonat und (△) Jodid.

Für die Geschwindigkeitskonstante k_{cb} ist $k_{cb}=k_{cb} \times (Cl^-)^2$ zu erwarten, wobei k_{cb} die Geschwindigkeitskonstante bei 1 M (Cl^-) ist und der Exponent 2 wegen der schon früher vorgeschlagenen Transportstöchiometrie von 2 Cl^- Ionen pro Transportzyklus steht (Gradmann 75, Mummert et al. 81). Um diese Aussage zu testen, wurden die Ergebnisse einer

Regression auf eine Potenzfunktion der Form $y = ax^b$ unterworfen. Bei einem Regressionskoeffizienten von $r^2=0,92$ ergab sich für den Exponenten b=2,21 ein Wert, der deutlich für die Stöchiometrie 2:1 spricht.

Die in Tabelle 3 weiterhin angegebenen Änderungen der Pumpenkonzentration N lassen folgendes erkennen:

- in den Jodid bzw. Benzolsulfonatmedien verringert sich die Carrierdichte N mit fallender Cl^--Konzentration und damit steigender I^-- bzw. Benzolsulfonat-Konzentration im Außenmedium.

- in den Sorbitmedien scheint ein leichtes Ansteigen der Carrierdichte N vorzuliegen. Dies ist aber bereits bei etwa 500 mM Cl^- in Sättigung. Führt man einen t-Test durch, um zu prüfen, ob dieses leichte Ansteigen insgesamt signifikant ist, so erhält man ein mittleres Signifikanzniveau von 0,098, d.h. man kann mit 90% Sicherheit davon ausgehen, daß dieses Ansteigen signifikant ist.

In Abbildung 15 sind diese Aussagen noch einmal anschaulich gemacht.

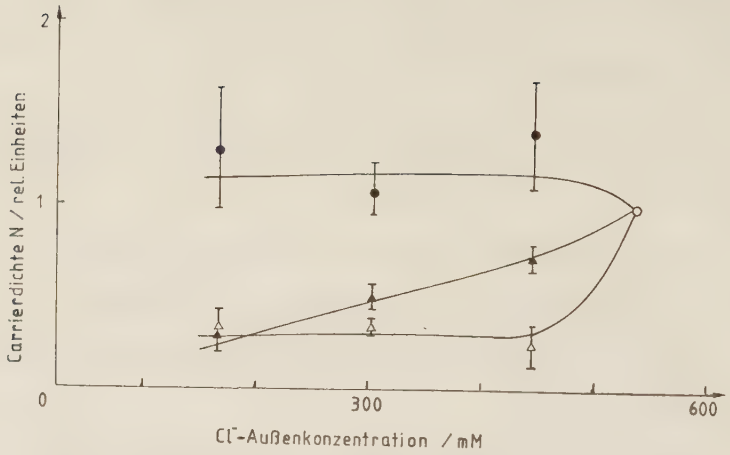

Abbildung 15
Veränderung der Carrierdichte N in Abhängigkeit von der Cl^- Außenkonzentration. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler nach Tabelle 3. Die Symbole stehen für die Ersatzmedien: (●) Sorbit, (▲) Benzolsulfonat und (△) Jodid.

In einem Einzelversuch wurde noch die Wirkung eines weiteren Austauschions auf die IU-Kurven der ECP untersucht. Cl^- wurde zu einer Endkonzentration von 310 mM durch HCO_3 ausgetauscht. Die beste Parameteranpassung an die gemessene Kurve wurde erreicht, wenn k_{cb} um den Faktor 0,24 zurückging und die Carrierdichte N auf 76 % des Ausgangswerts abfiel (vgl. Tabelle 5). Das Ergebnis stimmt gut mit den Werten von den anderen Austauschmedien überein, sodaß davon ausgegangen wird, daß HCO_3^- keine zusätzlichen Auswirkungen auf die IU-Kurve der ECP hat, außer den bereits beschriebenen.

4.2 Einfluß der Cl^--Außenkonzentration auf die stationären Membranstromspannungskurven

Wie in Kapitel 3.7. beschrieben, versteht man unter dem stationären Membranstrom denjenigen Strom, der sich auf "clamp-on" nicht mehr ändert (hier etwa 15 sec). Mißt man diesen Strom bei verschiedenen Spannungen, so stellt man fest, daß die Strom-Spannungskennlinie N-förmig verläuft, d.h. einen Bereich mit negativer Leitfähigkeit aufweist (Gradmann 1970, 1975).

Da in Abschnitt 4.1. ein Einfluß der Cl^--Außenkonzentration auf die IU-Kurven der Pumpe gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob dieser auch auf die Membran IU-Kurven festzustellen ist.

In Abbildung 16 sind die IU-Kurven der Membran einer einzelnen Zelle bei vier verschiedenen Cl^--Konzentrationen gezeigt. Die Leitfähigkeit, gemessen im linearen Bereich der Kurve, steigt von 11 Sm^{-2} in KSW auf 19 Sm^{-2} in den Sorbitlösungen, die untereinander keine Leitfähigkeitsunterschiede zeigen.

Dieses Ergebnis stimmt gut mit der Aussage des vorigen Kapitels überein, nach der in Sorbitmedien die Carrierdichte erhöht wird und damit die Gesamtleitfähigkeit steigt. Das Anwachsen der aktiven Pumpenelemente scheint schon bei niedrigen Sorbitkonzentrationen in Sättigung zu geraten (vgl. Abb. 15), so daß auch mit weiter fallender Cl^-- und

damit steigender Sorbitkonzentration keine weitere Änderung von N mehr eintritt.

Eine Änderung tritt jedoch mit fallender Cl^--Konzentration auf: Im Bereich >-150 mV bleiben zwar die negativen Leitfähigkeiten erhalten,das Maximum des Stroms (dg=0) tritt aber bei positiveren Membranspannungen auf. Bei KSW ist die Stelle g=0 bei -148 mV, in 459 mM Cl^- bei -138 mV, bei 310 mM Cl^- bei -130 mV und schließlich bei 170 mM Cl^- bei -125 mV. Der maximale Strom steigt mit fallender Cl^--Konzentration und zwar von etwa 160 mA m^{-2} in KSW auf rund 300 mA m^{-2} in den Sorbitlösungen.

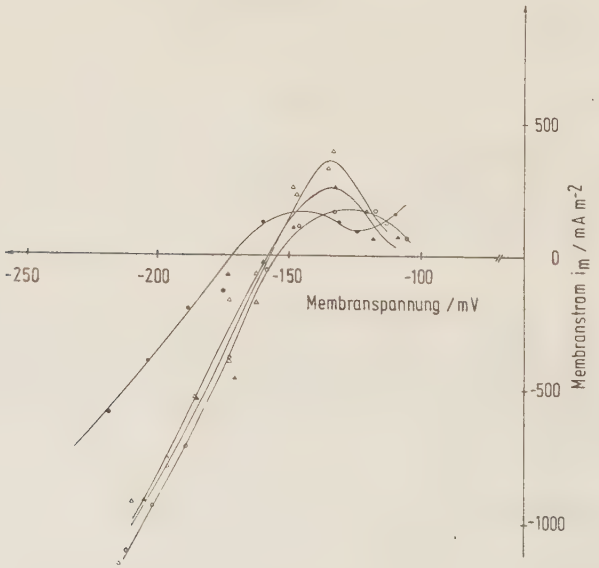

Abbildung 16
Stationäre IU-Kurven der Membran bei 4 verschiedenen Cl^- Konzentrationen. KSW wurde mit isotonischer Sorbitlösung verdünnt. Die Symbole zeigen die Meßwerte an, (●) KSW, (▲) 459 mM Cl^-, (△) 310 mM Cl^- und (○) für 170 mM Cl^-. Die durchgezogenen Linien sollen die Meßpunkte verbinden.

In Abbildung 17 sind entsprechende IU-Kurven der Membran in Benzolsulfonatmedien gezeigt. Auch hier bleibt die negative Leitfähigkeit erhalten. Die maximale Leitfähigkeit fällt von 22 Sm^{-2} in KSW auf 15 Sm^{-2} in 459 mM Cl^- auf 14 Sm^{-2} in 310 mM Cl^- im Außenmedium. Die IU-Kurve für 170 mM Cl^- zeigt eine Leitfähigkeit von 23 Sm^{-2}, also einen relativ hoher Wert. Jedoch wird aufgrund der niedrigen Membranruhespannung (-125 mV) hier ein zu großes Leck vermutet, da die Membranruhespannung üblicherweise in vergleichbaren Lösungen bei -150 mV lag.

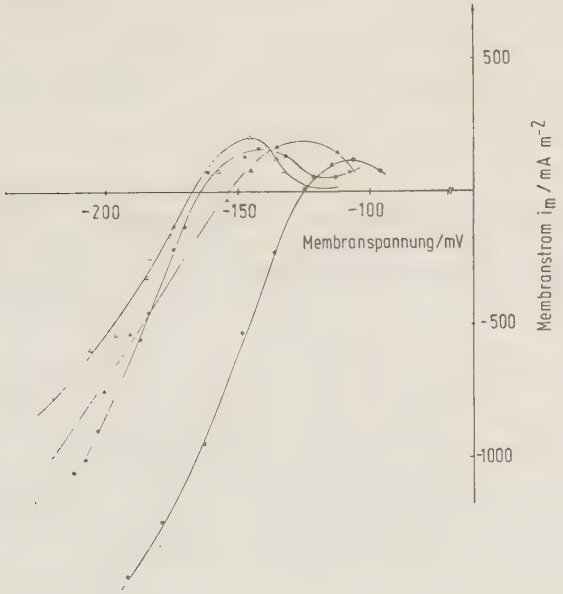

Abbildung 17
Stationäre IU-Kurven der Membran bei verschiedenen Cl^- Konzentrationen. Als Austauschion wurde Benzolsulfonat verwendet. Die Symbole zeigen die Meßwerte bei verschiedenen Konzentrationen an: (●) KSW, (△) 459 mM Cl^-, (▲) fÜr 310 mM Cl^- und (○) für 170 mM Cl^-. Die durchgezogenen Linien sollen die Meßwerte verbinden.

Die sinkende Leitfähigkeit bei fallender Cl^--Konzentration ist wiederum mit den Werten der Tabelle 3 vergleichbar: In Benzolsulfonatmedien nimmt die Carrierdichte N ab. Wie in Gleichung (23) gezeigt, ist dies direkt proportional zur Leitfähigkeit g_o der Pumpe. Die Kurve für 170 mM Cl^- Außenkonzentration ist, wie eben erwähnt sicherli bei einer zu großen Leckleitfähigkeit gemessen worden. Dies würde die große Steigung dieser Kurve erklären, die ja über der der Kontrollkurve liegt.

Der maximale positive Strom bleibt bei etwa 200 mA m^{-2} in allen 4 Benzolsulfonatmedien konstant, allerdings verändert sich die Membranspannung bei der dies Maximum erreicht wird. In KSW ist dieses Maximum bei -145 mV und fällt auf -138 mV in 459 mM Cl^- und auf -127 mV in 310 mM Cl^-. Der Wert bei der Kurve in 170 mM Cl^- ist mit -107 mV sicher zu positiv (vgl. oben). Die Stromspannungskurven in Jodidlösungen unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der Benzolsulfonatlösungen, es wird deshalb auf eine getrennte Darstellung verzichtet. In Abbildung 18 sind die Benzolsulfonatkurven mit Leckkorrekturen gezeichnet, d.h. es wurde ein variables Leck eingeführt, so daß die Membranruhespannungen den üblichen Werten entsprechen.

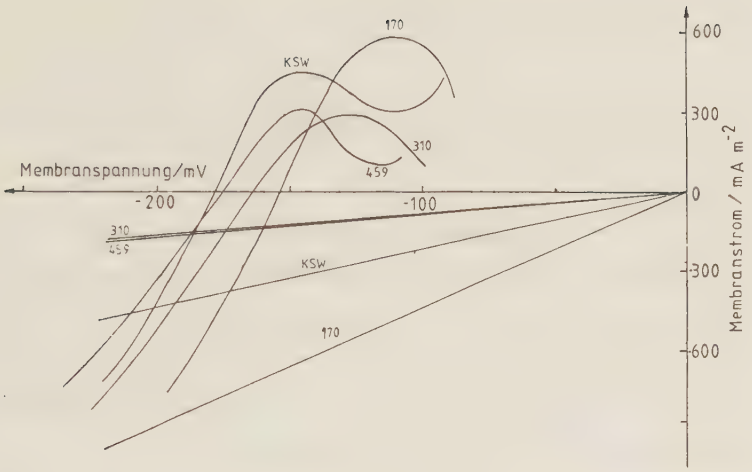

Abbildung 18
Stationäre IU-Kurven der Membran bei verschiedenen Cl^- Konzentrationen. Die gemessenen Kurven (Abb. 17) sind hier durch die Wahl eines geeigneten Lecks so korrigiert, daß die Ruhespannungen den gemessenen Mittelwerten entspricht.

Zusammenfassend kann man zur Substratabhängigkeit der stationären IU-Kurven folgendes sagen: Die gemessenen Änderungen der stationären Membran IU-Kurven, wie Änderung der Leitfähigkeit, der Größe des maximalen Stroms und der Membranspannung bei der der maximale Strom fließt, verlaufen analog zu den Änderungen der gemessenen IU-Kurven der Pumpe. Es ist also offensichtlich kein Einfluß eines weiteren Transportsystems notwendig, um die gemessenen IU-Kurven zu beschreiben. Die Möglichkeit, daß auf Cl^--Wegnahme ein größerer Leckstrom fließt muß abgelehnt werden, da in

Sorbitlösungen der maximale Strom steigt. Auch kann der Leckstrom nicht kleiner werden mit fallender Cl^- Konzentration, da der maximale Strom bei weniger negativen Spannungen erreicht wird.

4.3 Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Impedanz der elektrogenen Cl^- Pumpe

Die bisherigen Betrachtungen waren auf die Analyse zeitinvarianter Ereignisse beschränkt. Das bedeutet im wesentlichen, daß sich die Konzentrationen der einzelnen Carrierzustände in der Zeit nicht ändern (vgl. Gleichung (8)). In diesem Abschnitt wird die Analyse auf zeitabhängige Eigenschaften der Cl^--Pumpe ausgedehnt.

4.3.1 Nachweis der linearen Übertragungseigenschaften der Pumpe

Zuerst mußte die Voraussetzung für die Gültigkeit der Frequenzganganalysen, nämlich die Linearität des Übertragungssystems überprüft werden. Dazu stehen zwei einfache Möglichkeiten zur Verfügung:

- Nachweis einer linearen Beziehung zwischen Eingangsspannung und gemessener Stromantwort, zumindest in dem Bereich in dem die Messungen gemacht werden. Dieser Nachweis ist in Abbildung 19 gezeigt, dabei wurde die Spannung -140 mV als Testspannung ausgewählt, da vom Verlauf der Stromspannungskurve (vgl. Abb. 10-12) hier am ehesten Nichtlinearitäten zu erwarten sind. Da bei 10 kHz und 1 Hz die Abhängigkeit linear ist, wird für

den Bereich dazwischen ebenfalls auf Linearität geschlossen.

- Der Ausgang des Systems (Strom) muß ebenfalls eine unverzerrte Sinusschwingung sein, wie der Eingang. Diese visuelle Kontrolle war bei jeder Messung möglich und wurde durchgeführt. Wenn Verzerrungen auftraten, wurde die Amplitude des Eingangssignals erniedrigt, bis das Ausgangssignal wieder sinusförmig war (vgl. auch Abbildung 8).

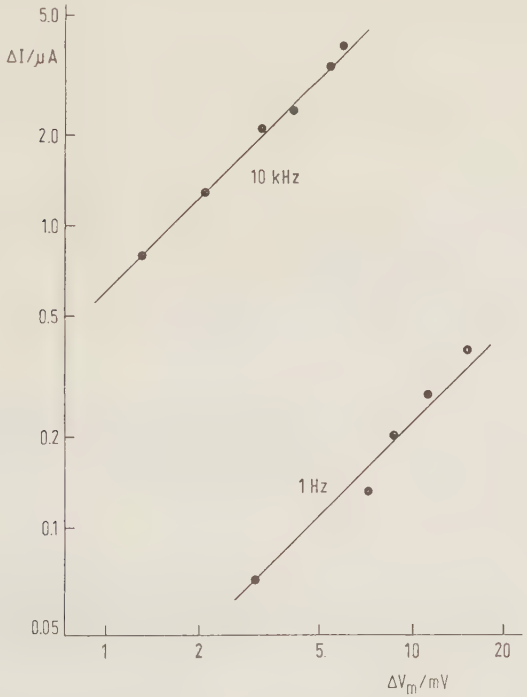

Abbildung 19
Nachweis der linearen Beziehung zwischen Eingang und Ausgang des Systems.

4.3.2 Messung der Frequenzgänge bei verschiedenen Spannungen

Zwei Frequenzgänge bei den Membranspannungen -120 mV und -190 mV sind im Bode-Diagramm der Abbildung 20 dargestellt. Ein Frequenzgang bei der Spannung -70 mV ist in Abbildung 21 gezeigt. Die Punkte sind die gemessenen Werte, die durchgezogenen Linien sind die Ergebnisse einer Kurvenanpassung, auf die später noch näher eingegangen wird. Anhand dieser beiden Abbildungen sollen folgende Aussagen verdeutlicht werden:

- Die Gleichspannungsverstärkung (Widerstand bei Frequenzen < 5Hz) ist spannungsabhängig.

- Die Steigung des Frequenzgangs bei hohen Frequenzen (> 5 kHz) ist ungefähr -1. Daraus kann man auf die Wirksamkeit einer Zeitkonstanten in diesem Frequenzbereich schließen.

- Der flache Verlauf der Frequenzgänge in Abbildung 20 im Bereich 50 bis 1000 Hz deutet auf mindestens eine weitere Zeitkonstante.

- Die Phasennacheilung des Stroms überschreitet nicht $-\pi/4$, ein weiterer Hinweis auf eine wirksame Zeitkonstante im hochfrequenten Teil.

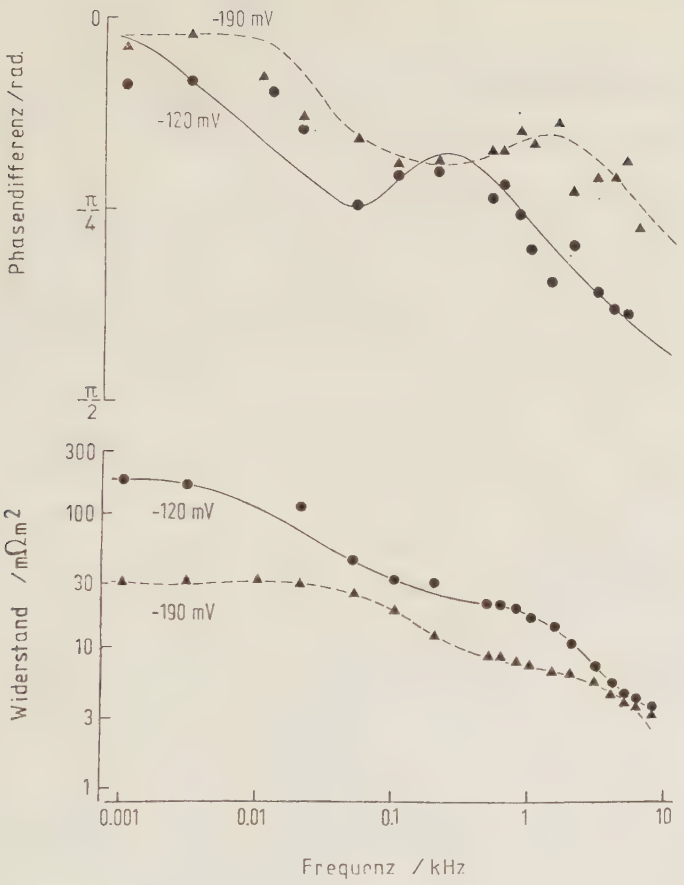

Abbildung 20
Bode Plot bei den Membranspannungen -190 mV und - 120 mV. Die Linien sind das Ergebnis einer Kurvenanpassung, die Meßpunkte sind durch die Symbole gekennzeichnet.

Die exaktere Analyse der Frequenzgänge wurde mit einem Rechnerprogramm durchgeführt, das die Parameter einer vorgegebenen Übertragungsfunktion an die gemessenen Werte

annähert. Mit der Auswahl der geeigneten Übertragungsfunktion beschäftigt sich der nächste Abschnitt.

4.3.3 Auswahl der geeigneten Übertragungsfunktion

Bei der Formulierung einer Übertragungsfunktion mußten folgende Punkte berücksichtigt werden.

- Die Phasennacheilung überschritt nie signifikant $-\pi/4$. Daraus konnte man schließen, daß der Grad des Nennerpolynoms den des Zählers um eins überschritt. Damit war der erste Hinweis auf ein sogenanntes Phasenminimalsystem gegeben (Varjú 77).

- Die Steigung des Amplitudenfrequenzgangs im Bereich 50 Hz bis 1kHz war zu flach , verglichen mit dem stärkeren Abfall bei Frequenzen > 1 kHz, um mit einer Übertragungsfunktion mt lediglich einer Zeitkonstanten beschrieben werden zu können. Andererseits war die Steigung deutlich ungleich 0, wie auch aus dem Phasenfrequenzgang zu erkennen ist (der Phasenfrequenzgang stellt im wesentlichen die Steigung des Amplitudenfrequenzgangs dar (Bode 64)).

Aus diesen Überlegungen ergab sich die einfachste Übertragungsfunktion:

$$\vec{R} = \text{const} \frac{1+p\tau_n}{(1+p\tau_1)(1+p\tau_2)} \qquad 28$$

Diese Übertragungsfunktion erwies sich als hinreichend zur Beschreibung der experimentellen Daten im Bereich - 120 bis -240 mV. Bei positiveren Spannungen (-70 mV) war die

Beschreibung mit einer einzelnen Zeitkonstanten ausreichend:

$$\vec{R} = \text{const} \frac{1}{1 + p\tau_1} \qquad 29$$

Darauf wird im nächsten Kapitel noch näher eingegangen.

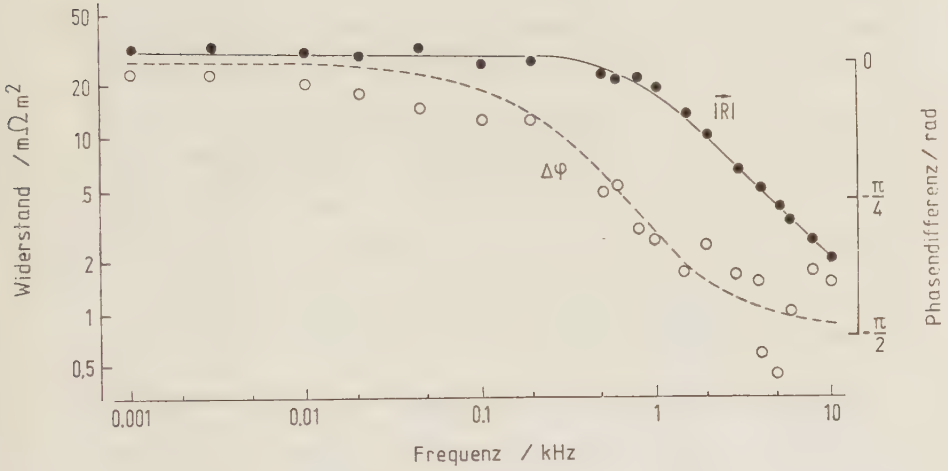

Abbildung 21
Bode Plot bei der Membranspannung -70 mV. Vergleiche Abbildung 20.

4.3.4 Ergebnisse der Kurvenanpassungen

Aus den Kurvenanpassungen erhält man 4 Kenngrößen: die Gleichspannungsverstärkung (Konstante), 2 Polstellen und eine Nullstelle. Auf die Konstante, die identisch ist mit dem stationären Widerstand der Pumpe, wird im nächsten Abschnitt noch näher eingegangen, so daß man sich an dieser

Stelle auf Beschreibung der Pol- und Nullstellen beschränken kann. Pol- bzw Nullstellen sind diejenigen Frequenzen f_i bei denen der Nenner bzw. der Zähler der Übertragungsfunktion Null wird. Diese Frequenzen f_i rechnet man mittels $\tau_i=(2\ f_i)^{-1}$ in Zeitkonstanten um. In Tabelle 4 sind nun die Ergebnisse aller Kurvenanpassungen bei Spannungen < -120 mV angegeben. Alle drei Zeitkonstanten sind demnach spannungsabhängig mit einem Minimum bei -180 mV und steigende Werte für höhere und niedrigere Spannungen. Bei -120 mV sind alle drei Zeitkonstanten etwa um den Faktor drei größer als bei - 180 mV. Bei hyperpolarisierten Membranen wird dieser Faktor bereits bei -205 mV erreicht, die Zeitkonstanten werden weiterhin größer, jedoch ist der absolute Wert wegen der geringen Anzahl der Messungen in diesem Bereich unsicher.

Ein zweites wichtiges Ergebnis kann man dieser Tabelle entnehmen: Bei keiner Spannung ist die Nullstelle so groß wie eine der beiden Polstellen; wäre dies der Fall, so würde eine Polstelle ausreichen, um den Frequenzgang zu beschreiben. Es kürzt sich dann die Nullstelle gegen eine Polstelle in der Übertragungsfunktion heraus. Um dies etwas exakter zu fassen wurde in der Tabelle 4 das Verhältnis zwischen Nullstelle und derjenigen Polstelle angegeben, die im selben Zeitbereich liegen. Dies Verhältnis ist in allen Fällen ungleich eins, in 90% aller Fälle sogar größer zwei.

Kennnr.	Konstante	τ_n/ms	τ_1/ms	τ_2/ ms	τ_1/τ_n	V_m
296240	471	1,44	3,06	0,31	2,13	-240
296205	430	0,98	3,37	0,14	3,44	-205
187205	171	0,17	0,70	0,03	4,12	-205
187190	228	0,30	1,24	0,07	4,13	-190
157190	326	0,53	2,30	0,05	4,34	-190
253190	171	6,84	11,66	0,04	1,70	-190
253191	100	0,53	1,10	0,05	1,99	-190
217190	116	0,26	0,59	0,06	2,27	-190
296180	394	0,43	1,69	0,10	3,93	-180
105180	139	0,32	1,30	0,03	4,06	-180
55180	422	0,01	0,16	0,003	16,00	-180
35180	44	0,03	0,13	0,01	4,33	-180
313180	104	0,22	0,33	0,01	1,50	-180
253180	83	0,18	0,26	0,03	1,44	-180
157160	369	0,61	2,85	0,05	4,67	-160
296160	331	0,57	1,86	0,11	3,26	-160
105160	70	0,09	0,20	0,03	2,22	-160
55160	227	0,69	1,80	0,07	2,61	-160
35160	42	0,05	0,14	0,01	2,80	-160
313160	100	0,24	0,38	0,02	1,58	-160
253160	97	0,41	0,78	0,04	1,90	-160
157140	519	0,67	4,21	0,05	6,28	-140
296140	529	0,39	2,36	0,08	6,05	-140
186140	148	0,36	1,18	0,06	3,28	-140
105140	166	0,44	1,10	0,07	2,61	-140
55140	76	0,16	0,29	0,02	1,81	-140
35140	51	0,18	0,30	0,05	1,67	-140
313140	238	0,21	0,65	0,03	3,10	-140
253140	288	1,90	4,73	0,07	2,49	-140
187120	127	0,83	1,39	0,20	1,67	-120
157120	1830	1,88	13,10	0,17	6,97	-120
67120	537	0,40	1,53	0,07	3,83	-120
186120	439	0,08	1,53	0,02	19,13	-120
313120	559	0,41	4,82	0,06	11,76	-120

Tabelle 4
Ergebnis der Computernäherung der Paramater der Übertragungsfunktion aus Gl. (28) an die gemessenen Werte. Angegeben sind die Zeitkonstanten der beiden Polstellen und die Zeitkonstante der Nullstelle, sowie die Gleichspannungsverstärkung. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Werte bei - 70 mV fallen aus dem bisher beschriebenen Rahmen heraus und sind deshalb in einer eigenen Tabelle (5) aufgeführt. Natürlich rechnet der Computer Näherungen mit

der gegebenen Übertragungsfunktion aus, d.h. er berechnet eine Null- und zwei Polstellen. Bei zwei Messungen stimmen aber Null- und eine Polstelle überein, so daß eine Polstelle reicht, um diese Frequenzgänge zu beschreiben. Auch wird der Fehler gemessen an der Summe der Abweichungsquadrate zwischen Meßwerten und berechneten Werten nur unwesentlich größer. Die dritte Messung zeigt aber eine deutliche Nullstelle, hier ist die Beschreibung mit allen drei Zeitkonstanten unerläßlich, um eine vernünftige Anpassung zu erhalten. Eine Erklärung für diese Messung ist bisher nicht gefunden worden, es wird aber davon ausgegangen, daß dies eine nicht typische Messung war.

Kennnr.	F / F'	τ_n	τ_1	τ_2	τ_1/τ_n	τ'_1
15770	324/336	1,79	2,14	0,20	1,19	0,24
7770	967/1038	1,96	3,29	0,52	1,68	0,76
6770	297/892	2,54	11,38	0,26	4,48	0,33

Tabelle 5
Ergebnisse der Parameteranpassungen bei den Meßdaten der Membranspannung -70 mV. Gegenübergestellt sind die Kurvenanpassungen nach Gleichungen (28) und (29) (gestrichene Werte). F bzw. F' ist der Fehler.

In Abbildung 20, aber auch in Abbilung 21 scheinen einige Meßpunkte sowohl im Amplituden- als auch im Phasenfrequenzgang deutlich neben der errechneten Kurve zu liegen. Dies könnte auf weitere Zeitkonstanten deuten, doch ist die Streuung der Meßwerte zur Zeit noch so groß, daß eine Erweiterung der Übertragungsfunktion nicht gerechtfertigt

erscheint.

Die Pol- Nullstellen Analyse wird in der Elektrophysiologie selten durchgeführt, da es eine rein abstrakte Beschreibung ist. (Was kann man sich schon unter einem komplexen Widerstand vorstellen?) Im nächsten Abschnitt wird deshalb versucht, diesselben Ergebnisse anhand eines elektrischen Ersatzschaltbildes darzustellen und damit den üblichen elektrophysiologischen Weg zu beschreiten.

4.3.5 Darstellung der Ergebnisse mithilfe eines Ersatzschaltbildes

Nachdem die Übertragungsfunktion gefunden war, erwies sich der Entwurf eines entsprechenden Ersatzschaltbildes als nicht mehr schwierig. Die zwei Polstellen verlangen mindestens zwei Kapazitäten mit zwei Widerständen die Nullstelle deutet auf eine Parallelanordnung der oben erwähnten Schaltelemente. Eine mögliche Anordnung ist in Abbildung 22 gezeigt.

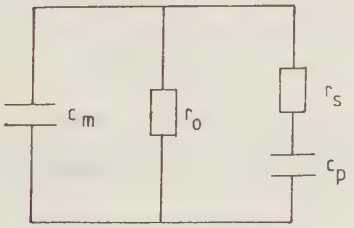

Abbildung 22
Ersatzschaltbild der Cl^--Pumpe mit c_m (biophysikalische Membrankapazität). r_o der stationäre Widerstand der Pumpe, r_s (Serienwiderstand) und c_p (Kapazität der Pumpe) geben das nicht-stationäre Verhalten der Pumpe an.

- der Widerstand r_o trägt dem Gleichspannungsanteil Rechnung. Er stellt damit den stationären Widerstand der Pumpe dar. Der Widerstand anderer Transportsysteme kann in diesem Spannungsbereich vernachlässigt werden.

- der Kondensator c_m beschreibt die "normale" biophysikalische Membrankapazität.

- Der Zweig mit dem Widerstand r_s in Serie zur Kapazität c_p ist in der Lage die zweite Polstelle zu liefern.

An dieser Stelle sei eine kurze Bemerkung zu Ersatzschaltbildern eingeschoben. Die Anordnung der Einzelteile ist nicht geometrisch zu nehmen. Oft sind mehrere Schaltelemente zusammen notwendig, um einen einzelnen Sachverhalt zu beschreiben. Der Spannungsabfall über r_s zum Beispiel ist biologisch bedeutungslos, auch muß die Anordnung r_s in Serie zu c_p nicht der Anordnung in der Membran entsprechen, lediglich das Verhalten des Gesamten ist äquivalent zu dem der Membran.

Den Zusammenhang zwischen den vier Größen des Analogschaltkreises und den vier Konstanten aus der Übertragungsfunktion erhält man aus dem Koeffizientenvergleich:
Die Leitfähigkeit des Systems aus Abbildung 22 ist

$$G = \frac{1}{r_o} + pc_m + \frac{1}{r_s + \frac{1}{pc_p}} \qquad 30$$

$$G = \frac{1}{r_o} \frac{1 + p(r_o c_m + r_s c_p + r_o c_p) + p^2 r_o r_s c_p c_m}{1 + p r_s c_p} \qquad 31$$

durch Koeffizientenvergleich mit der Übertragungsfunktion aus dem vorigen Abschnitt erhält man:

$$r_o = \text{const} \qquad c_p = \frac{1}{r_o}(\tau_1 + \tau_2 - \tau_{1\,2}/\tau_n - \tau_n)$$
$$r_s = \tau_n / c_p \qquad c_m = \tau_1 \tau_2 / r_o \tau_n \qquad 32$$

In Abbildung 23A ist nun g_o $(=1/r_o)$ bei verschiedenen Spannungen aufgetragen. Man sieht denselben Kurventyp mit einem Maximum bei -180 mV, den man bei Messung der differentiellen Leitfähigkeit zur Ermittlung der stationären Stromspannungskurve der Pumpe erhält (Ableitung von Abb. 10-12). In den Abbildungen 23 und 24 ist das geometrische Mittel und der geometrische Fehler angegeben.

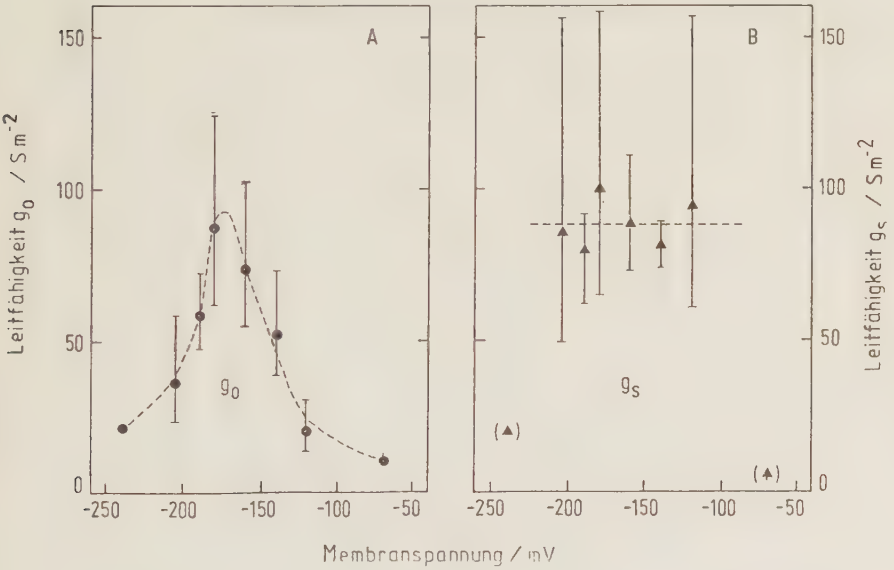

Abbildung 23
Abhängigkeit der stationären Leitfähigkeit g_o(A) und der seriellen Leitfähigkeit g_s (Abb. B) von der Membranspannung. Die eingezeichneten Kurven verbinden die Meßpunkte.

In Abbildung 23B ist nun g_s $(=1/r_s)$ gegen die Membranspannung aufgetragen. Es ist keine Spannungsabhängigkeit erkennbar, jedoch ist die Streuung so groß, daß

eventuelle Spannungsabhängigkeiten darin untergehen. Der Grund für diese Streuung ist unbekannt. In Abbildung 24 sind die Kapazitäten c_m und c_p gegen die Spannung aufgetragen. cm liegt mit 8,0 mF m^{-2} im Erwartungsbereich von 8 - 12 mF m^{-2} für biologische Membranen (Cole 1968) und ist offensichtlich konstant zwischen -70 und -240 mV.

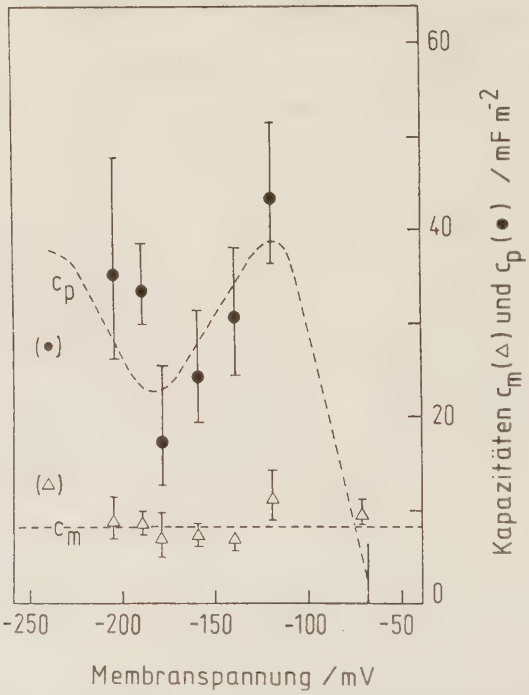

Abbildung 24
Abbhängigkeit der Kapazitäten c_m und c_p von der Membranspannung. c_m ist offensichtlich spannungsunabhängig, c_p zeigt eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit. Die eingezeichneten Kurven sollen die Meßpunkte verbinden.

c_p zeigt eine deutliche Einkerbung bei -180 mV und steigt bis -120 mV deutlich an. Das mittlere Signifikanzniveau für dieses Ansteigen liegt bei 0,02. Der Wert für c_p bei -70 mV

liegt innerhalb der Meßgenauigkeit von ca. 7 mF m^{-2} für c_p, d.h. eine Polstelle ist zur Beschreibung der Requenzgänge bei dieser Spannung hinreichend. Zu negativeren Spannungen steigt c_p wieder an. Leider konnte nur bis -240 mV gemessen werden, da der stationäre Strom bei stark hyperpolarisierten Membranen nicht sehr stabil war.

Festzuhalten ist abschließend, daß c_p deutlich über c_m liegt und eindeutig spannungsabhängiges Verhalten zeigt. Auf die Bedeutung dieses Ergebnisses wird in der Diskussion noch näher eingegangen.

5. Diskussion

Die Ergebnisse werden nun mithilfe reaktionskinetischer Modelle analysiert.

5.1 Veränderte Cl^--Konzentration

5.1.1 Elektromotorische Kraft der Pumpe

Ein zyklisches Reaktionssystem ist im thermodynamischen Gleichgewicht, wenn das Produkt der Geschwindigkeitskonstanten in einer Richtung gleich groß ist dem Produkt der Geschwindigkeitskonstanten in Gegenrichtung. Dies ist das Gesetz der mikroskopischen Reversibilität. Für das 3-Zustandsmodell gilt dann:

$$k_{ab}k_{bc}k_{ca} = k_{ba}k_{ac}k_{cb} \qquad 33$$

Nun soll aber in k_{ab} und k_{ba} die Spannungsabhängigkeit enthalten sein (gemäß Gleichung 5a,b) und in k_{ca} bzw. k_{cb} die Bindung bzw die Abgabe des Substrats gemäß:

$$k_{ca}=k_{ca}\,(S_i)^n \text{ bzw. } k_{cb}=k_{cb}\,(S_o)^n \qquad 34$$

mit

S=Konzentration des Substrats

n=Anzahl der transportierten Teilchen

k_{ij}= Geschwindigkeitskonstante bei 1 M Substrat

Damit wird aus Gleichung (34) und (33):

$$\frac{k^o_{ba}k_{ac}k_{cb}}{k^o_{ab}k_{ca}k_{bc}} \text{ zu } = n\,\ln\left(\left[S_i\right]/\left[S_o\right]\right) \qquad 35$$

Nach dem Gesetz der mikroskopischen Reversibilität muß im thermodynamischen Gleichgewicht der Ausdruck $k^{o}_{ab}k_{ca}k_{bc}/k^{o}_{ba}k_{ac}k_{cb}$ eins ergeben, so daß übrigbleibt:

$$z\,u = n\,\ln([S_i]/[S_o]) \qquad 36$$

Wird nun bei unveränderter Innenkonzentration des Substrats die Außenkonzentration variiert, so erhält man ein neues thermodynamisches Gleichgewicht, das wie folgt berechnet werden kann:

$$z\,u' = n\,\ln([S_i]/[S_o]') \qquad 36'$$

Für die Änderung des Gleichgewichts erhält man dann:

$$z\,u - z\,u' = n\,\ln([S_i]/[S_o]) - n\,\ln([S_i]/[S_o]') \qquad 37$$

Wird nun noch die normierte Membranspannung u ausgeschrieben, so erhält man:

$$\Delta E = \frac{RT}{F}\,\ln\frac{[S_o]'}{[S_o]} \qquad 38$$

Gleichung (38) stellt nichts anderes als die Nernst-Gleichung dar. Damit sind die in Tabelle 3 errechneten Werte der elektromotorischen Kraft der Pumpe formal gerechtfertigt. Hieraus ergibt sich für z =n eine direkte Proportionalität des thermodynamischen Gleichgewichts vom Logarithmus der Substratkonzentration. Diese Aussage gilt für die Cl^--Pumpe, da die Ladung eines Cl^- -1 ist. Die negative Ladung wird rechnerisch durch Berechnung des reziproken Werts des Verhältnisses der Substratkonzentrationen berücksichtigt.

5.1.2 Das 3-Zustandsmodell und IU-Kurven

Die Beschreibung der Abhängigkeit der IU-Kurven von der Substratkonzentration muß mithilfe eines 3- bzw. 4-Zustandsmodells erfolgen (Hansen et al. 1981). Fär unsere Zwecke erweist sich ein 3-Zustandsmodell als hinreichend, weil beide variierte Reaktionen (Cl^- -Bindung und Ladungstransport) nicht durch langsame Reaktionen getrennt sind. In Tabelle 6 sind die Mittelwerte und Standardfehler der Geschwindigkeitskonstanten des 3-Zustandsmodells angegeben, wie sie mit dem im vorigen Kapitel erläuterten Annäherungsprogramm ermittelt wurden. Für die Ladungszahl wurde z= -2 gesetzt und die Carrierdichte N wurde mit 60 nmol m^{-2} angenommen (Begründung siehe unten).

$$k_{ab} = (2{,}97 \pm 0{,}05)\ 10^{-1} \exp(zu/2)$$

$$k_{ba} = (1{,}45 \pm 0{,}24)\ 10^{6} \exp(-zu/2)$$

$$k_{bc} = (1{,}67 \pm 0{,}20)\ 10^{6}$$

$$k_{cb} = (2{,}50 \pm 0{,}75)\ 10^{6}$$

$$k_{ac} = (5{,}58 \pm 0{,}78)\ 10^{2}$$

$$k_{ca} = (8{,}70 \pm 1{,}08)\ 10^{2}$$

Tabelle 6

Geschwindigkeitskonstanten des 3-Zustandsmodells in s^{-1}. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardfehler aus 35 IU-Kurven.

Aus den Absolutwerten dieser Geschwindigkeitskonstanten (Tabelle 6) lassen sich folgende Schlüsse ziehen. Zum einen ist die Cl^--Bindung und Abgabe an der Außenseite eine sehr schnelle Reaktion, wie es für solche ionische Bindungen auch erwartet wird. Zum anderen sind offensichtlich die

Geschwindigkeitskonstanten k_{ac} bzw. k_{ca} limitierend für die Transportrate, wenn die Spannungsabhängigkeit des Transports nicht mehr ausschlaggebend ist. Dies gilt für größere Entfernungen (+ 50 mV) vom thermodynamischen Gleichgewicht. Die Umsatzrate ist dann in der Größenordnung von ca. 600 s^{-1} und ist damit durchaus vergleichbar mit den Umsatzraten anderer Ionenpumpen, z.B. Bakteriorhodopsin (Lozier et al. 1977), Na^+-K^+-ATPase (Skou 1982) und H^+-ATPase (Gradmann et al. 1982a).

Die Änderung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cb} bei veränderter Cl^--Konzentration entspricht den Erwartungen. Die Meßwerte liegen tatsächlich dicht bei einer Parabel (vgl. Abb. 13), wie sie bei der Transportstöchiometrie von 2 Cl^- pro Zyklus erwartet werden muß. Die etwas zu hohen Werte bei niedrigen Cl^--Konzentrationen könnten auf einen Cl^--Efflux zurückzuführen sein (Mummert et al. 1981), der dann in der unmittelbaren Nähe der Membran eine etwas höhere Cl^--Konzentration verursacht als im Außenmedium eingestellt. Wesentlich ist jedoch, daß k_{cb} in allen verwendeten Ersatzmedien kleiner wird, d.h. Cl^- kann weder durch I^- noch durch Benzolsulfonat noch durch Bicarbonat in der Wirkung ersetzt werden. Auch in den Lösungen mit verringerter Ionenstärke (Sorbit) fällt k_{cb} in der erwarteten Weise. Dies wird so interpretiert, daß der Transportschritt der elektrogenen Pumpe hoch spezifisch sein muß.

Die Veränderungen der Carrierdichte in den verschiedenen Ersatzmedien (vgl. Abb. 15) führen auf folgende Inter-

pretation: Die Anionen I^-, HCO_3^- und Benzolsulfonat werden zwar an den Carrier gebunden, aber können nicht transportiert werden. Dadurch verringert sich die Dichte der aktiven Pumpen, wie es sich in einer Verringerung von N bemerkbar macht. Man könnte also durchaus diese Anionen als Inhibitoren des Transports verwenden, ohne dadurch in den Energiestoffwechsel der Zelle eingegriffen zu haben. Das Ansteigen der Carrierdichte N in den Sorbitmedien könnte damit erklärt werden, daß die Zelle versucht den Cl^--Einstrom trotz verringerter Cl^--Konzentration aufrecht zu erhalten. Wenn dies korrekt ist, wäre der Abfall der Carrierdichte in den anderen Ersatzmedien noch unterschätzt, denn auch in diesem Fall müßte die Zelle versuchen ihren Cl^--Einstrom aufrecht zu erhalten.

Substratspezifität

In einer Arbeit über Anionenspezifität der ECP wurde gefunden (Dieter 1979), daß der Ersatz von Cl^- im Außenmedium durch andere Anionen Depolarisierungen der Membranruhespannung hervorruft. Die Größe der Depolarisierung ging in der Reihe Brom<Jodid<Fluorid.

Da im vorigen Abschnitt gezeigt wurde, daß das thermodynamische Gleichgewicht der ECP nur von der Cl^- Konzentrationsänderung abhängt, müssen die unterschiedlichen Depolarisierungen auf eine unterschiedliche Leitfähigkeitsänderung der ECP zurückzuführen sein. Dies läßt sich mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen so erklären: Die Ersatzanionen konkurrieren mit Cl^- um die

Bindungsstelle am Carrier. Die "falsch"gebundenen Zustände führen zu einer Inaktivierung, da der Zyklus nicht weitergehen kann. Je nach Ersatzanion wird ein unterschiedlicher Anteil der Carrierdichte inaktiviert.

Diese Schlußfolgerungen werden durch die Ergebnisse der Sorbitmedien erhärtet. Tatsächlich wurde in den Sorbitmedien die Carrierdichte N nicht verringert, d.h. man kann davon ausgehen, daß der Carrier eine Anionenbindungsstelle hat, die relativ unspezifisch ist.

Enzymkinetische Bedeutung

In einer grundlegenden Arbeit (Sanders et al. 1984) zur Kinetik des Kotransports wurde gezeigt, daß der Einfluß der Substratkonzentrationen und der Membranspannung bei einfachen zyklischen Transportsystemen, Änderungen bei der Michaeliskonstanten K_m und der maximalen Geschwindigkeit des Substrattransports v_{max} des Systems hervorrufen kann. Je nach Größe der Geschwindigkeitskonstanten können sich dabei K_m oder v_{max} oder beides, gleich- oder gegenläufig verändern.

Um die vorliegenden Ergebnisse in diesen Zusammenhang zu stellen, wurde der substratabhängige, unidirektionelle Cl^- Einstrom der ECP berechnet. Dazu wird ein 4-Zustandsmodell benötigt (vgl. Abbildung 27), da die Cl^--Bindung und Abgabe sowohl an der Außenseite als auch an der Innenseite der Membran, sowie der spannungsabhängige und spannungsunabhängige Reaktionsschritt X_B nach X_A, bzw. X_D nach X_C explizit

in die Berechnung des Einwärtsstroms eingehen (Mummert et al. 81). Der unidirektionelle Cl^--Einwärtsstrom wird dabei nach folgender Formel berechnet:

$$i_u = z\ F\ k_{CBAD}\ N_C$$

k_{CBAD} ist dabei die zusammengefaßte Geschwindigkeitskonstante von X_C über X_B und X_A nach X_D. Sie ist gegeben durch:

$$k_{CBAD} = k_{CB}\ k_{BA}\ k_{AD} / (k_{AB}\ k_{BC} + k_{AD}(k_{BC} + k_{BA}))$$

In k_{BA} und k_{AB} ist wieder die Spannungsabhängigkeit enthalten, entsprechend Gleichung (5). Für die Geschwindigkeitskonstanten wurden die Werte aus Tabelle 6 zugrunde gelegt, k_{AD} wurde gleich k_{BC} und k_{AD} gleich k_{CB} gesetzt. Es wurde also angenommen, daß Be- und Entladung des Carriers an Außen- und Innenseite der Membran gleich sind. Berechnet man nun nach Gleichung (39) den spannungs- und substratabhängigen unidirektionellen Cl^--Einwärtsstrom, so erhält man die Michaelis-Menten Kinetik des Transportsystems. In Abbildung 27 ist hiervon die Lineweaver-Burk Auswertung angegeben. Zu beachten ist, daß auf der Abszisse der Kehrwert der Cl^--Konzentration im Quadrat verwendet wurde, wegen der Stöchiometrie von 2 Cl^- pro Transportzyklus. Man erkennt, daß sich sowohl K_m als auch v_{max} bei verschiedenen Spannungen unterscheiden. In Abbildung 28 ist K_m und v_{max} in Abhängigkeit von der Membranspannung angegeben.

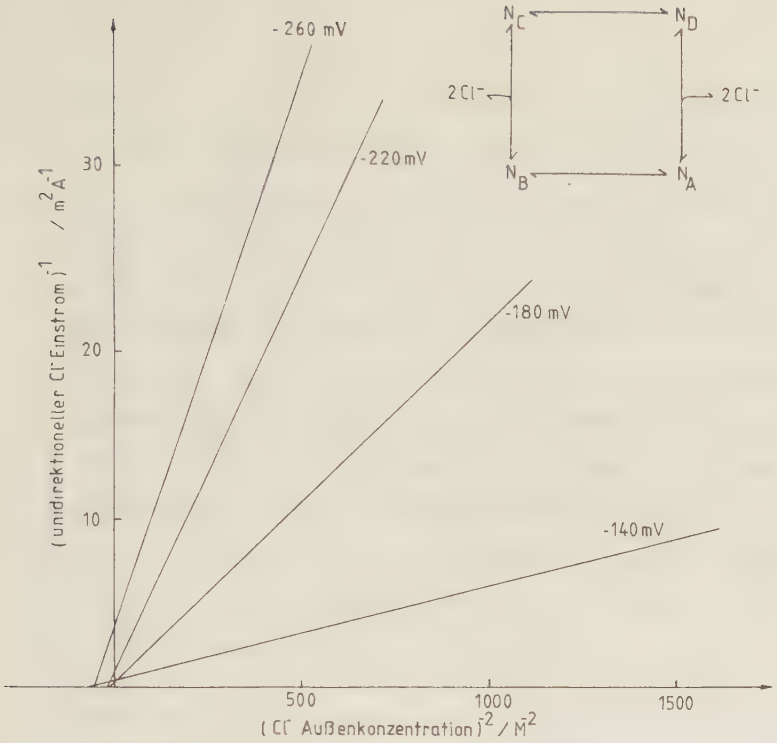

Abbildung 27
Lineweaver-Burk Auftragung des unidirektionellen Cl^--Einstroms durch die Pumpe gegen die Cl^--Konzentration im Quadrat bei verschiedenen Membranspannungen. Oben rechts in der Abbildung ist das 4-Zustandsmodell angegeben, mit dem der unidirektionelle Strom berechnet wurde (vgl. Gl. 39 und Tabelle 6).

Für v_{max} erkennt man im Spannungsbereich von -300 mV bis -40 mV ein sigmoiden Kurvenverlauf, bei -300 mV mit 0 beginnend und bei ca. -100 mV einen Sättigungswert von 4,5 A m^{-2} erreichend. Die maximale Änderung von v_{max} erfolgt zwischen -210 mV und -160 mV. Gerade in diesem Spannungsbereich ist jedoch K_m relativ konstant bei ca. 250 mM. Bei positiveren Spannungen als -100 mV ändert sich nur noch K_m, während v_{max} konstant bleibt. Dieselbe Aussage trifft für Spannungen

negativer als -260 mV zu. Zwischen -260 mV und -210 mV wird sowohl K_m, als auch v_{max} größer, während zwischen -160 mV und -100 mV v_{max} größer aber K_m wieder kleiner wird. Es werden also beim kinetischen Verhalten der ECP die von der Theorie gemachten Vorhersagen (Sanders et al. 1984) bestätigt, insofern als kompetitive Hemmung (Änderung der K_m bei konstantem v_{max}), nicht-kompetitive Hemmung (Änderung von v_{max} bei konstantem K_m) und unkompetitive Hemmung (Änderung von v_{max} und K_m) auch durch die Spannungsabhängigkeit in einem einfachen Reaktionsmodell, ohne Zusatzannahmen zu formulieren, zu erwarten sind.

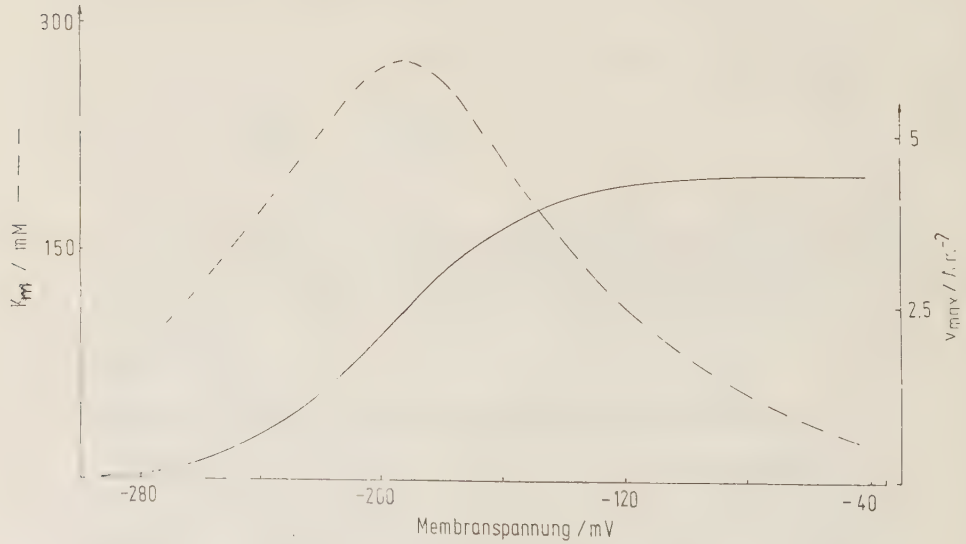

Abbildung 28
Michaeliskonstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit v_{max} für unidirektionellen Cl^--Einstrom durch die Cl^--Pumpe in Abhängigkeit von der Membranspannung.

5.1.3 Alternativen

Ladung des Carriermoleküls

Bei der Beschreibung der Reaktionszyklen wurde bisher angenommen, daß das Carriermolekül elektisch neutral ist und erst mit Bindung der Chloridionen eine elektrische Ladung erhält. Denkbar wäre auch der Fall, daß das Carriermolekül per se schon positiv geladen ist und damit der Substrat-Carrier Komplex elektrisch neutral wäre. Beide Fälle sind formal äquivalent. In Abbildung 29 sind zwei Reaktionszyklen gezeigt: der Fall A für den elektrisch neutralen Carrier und negativ geladenen Substrat-Carrierkomplex, sowie der Fall B für einen positiv geladenen Carrier und einen neutralen Substrat-Carrierkomplex.

Um zwischen den Modellen unterscheiden zu können, muß die kinetische Analyse erweitert werden, d.h. es muß zusätzlich zur Spannung ein weiterer Parameter verändert werden. Diese Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit mit veränderter Cl^- Außenkonzentration durchgeführt. Die Geschwindigkeitskonstante k_{cb} in Modell A bzw k_{bc} in Modell B seien beispielsweise um den Faktor 10 erniedrigt. Dies entspricht einer Erniedrigung der Cl^--Konzentration um den Faktor $\sqrt{10}$, gemäß Gleichung (10). In Modell A bleibt der positive Sättigungsstrom i_{sat}+ konstant, der negative steigt an. In Modell B bleibt der negative Sättigungsstrom isat-konstant,der positive steigt an. In beiden Fällen wird die Steigung flacher. Dieses Verhalten kann nun mit dem der IU Kurven der Abbildung 11 verglichen werden. (Es werden mit

diesem Beispiel nur die Ergebnisse von Experimenten mit Benzolsulfonatmedien exemplarisch diskutiert. Für die anderen Ersatzmedien gilt sinngemäß das Gleiche).

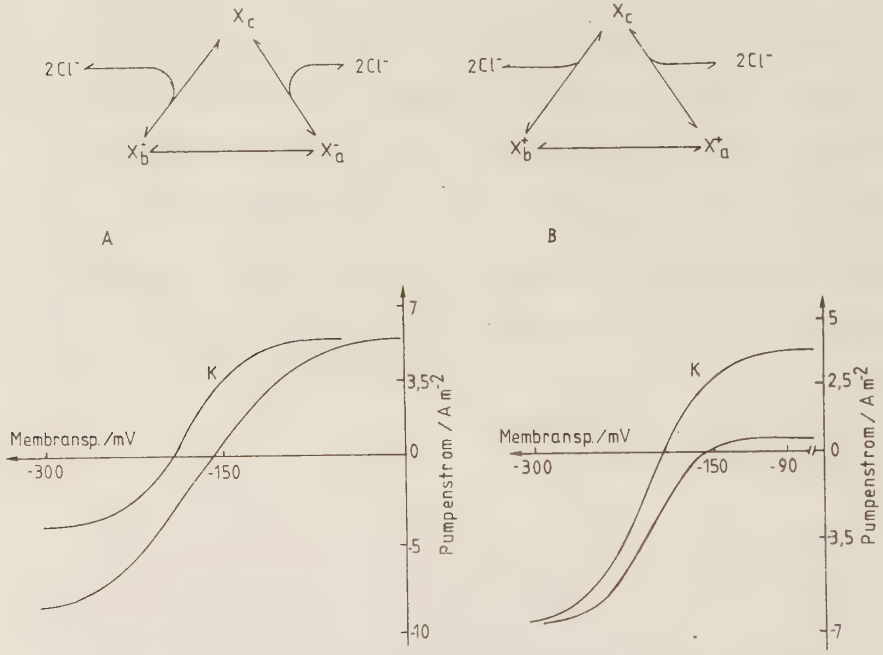

Abbildung 29
Zwei reaktionskinetische Modelle und die IU-Kurven beider Systeme für $\sqrt{10}$ fache Erniedrigung der Cl^--Konzentration links. Fall A zeigt den elektrisch neutralen Carrier und den geladenen Substrat-Carrier Komplex. Fall B zeigt den elektrisch neutralen Substrat-Carrier Komplex und den geladenen Carrier. Die Rechnungen der Kontrollkurven K wurden nach Gl. (9) mit den Werten der Tabelle 6 durchgeführt.

Nach Abbildung 11 fällt der positive Sättigungsstrom i_{sat}^+ von 4,33 Am^{-2} in der Kontrollkurve auf 2,80 Am^{-2} in der 459 mM Cl^--Lösung, d.h. auf 65%. In der 310 mM Cl^--Lösung ist i_{sat}^+ nur noch 1,47 Am^{-2}, d.h. 34% des Kontrollwerts und

schließlich nur noch 0,60 Am^{-2} in der 170 mM Cl^--Lösung, d.h. 14% des Ausgangswerts. Auf den Sättigungsstrom wirkt aber gleichzeitig die Carrierdichte N als Skalierungsfaktor. Sie fällt mit sinkender Cl^--Konzentration (vergl. Tabelle 3) in 459 mM Cl^- auf 72% des Ausgangwerts in Seewasser, in 310 mM Cl^- auf 35% und in 170mM auf 15% in dieser Meßserie. Der Rückgang von $i_{sat}+$ ist somit vollständig auf eine verringerte Carrierdichte zurückzuführen, die Veränderung der Geschwindigkeitskonstante k_{cb} hatte keinen Einfluß auf $i_{sat}+$. Andererseits treten bei den negativen Sättigungsströmen $i_{sat}-$ zwei gegenläufige Effekte auf. Zum einen wird $i_{sat}-$ kleiner mit sinkender Cl^--Konzentration, da die Carrierdichte N abnimmt. Zum anderen sollte $i_{sat}-$ größer werden, da k_{cb} kleiner wird (vergl. Abbildung 29). Aus Abbildung 11 erkennt man, daß die Änderung von $i_{sat}-$ weit geringer ist, als die von $i_{sat}+$. Bei 459 mM Cl^- geht $i_{sat}-$ von dem Kontrollwert 3,1 A m^{-2} in KSW auf 2,6 A m^{-2} zurück, d.h. auf 84%. Bei 310 mM Cl^- beträgt $i_{sat}-$ 1,33 Am^{-2} (43% des Kontrollwerts) und bei 170 mM Cl^- ist $i_{sat}-$ 0,9 A m^{-2}, d.h. 29% des Ausgangswerts (vgl. Abbildung 11). Man erkennt also, daß die Änderung von $i_{sat}-$ nicht so drastisch ist, wie die von $i_{sat}+$. Andererseits ist die Veränderung von $i_{sat}-$ nicht allein mit einer veränderten Carrierdichte N erklärbar, die Verkleinerung von k_{cb} macht sich also tatsächlich beim negativen Sättigungsstrom bemerkbar.

Dadurch ist es möglich, zwischen den beiden Modellen A und B das besser zutreffende auszuwählen. Die Veränderung von $i_{sat}+$ ist zurückzuführen auf die veränderte Carrier-

konzentration, eine zusätzliche Veränderung von i_{sat}^+ durch Erniedrigung von k_{cb} kann ausgeschlossen werden, vor allem in der Stärke, wie dies von Modell B gefordert wird. (Erniedrigung von i_{sat}^+ auf 22% des Ausgangswerts bei Erniedrigung von k_{bc} um den Faktor 10). Die Veränderung des negativen Sättigungsstroms entspricht dem erwarteten Verhalten nach Modell A. Es kann deshalb weiterhin davon ausgegangen werden, daß das Carriermolekül elektrisch neutral ist und durch Bindung der Cl^--Ionen der entstandene Carrier-Substrat Komplex negativ geladen wird.

Veränderung von k_{cb} und k_{ca}

Eine fast ebenso gute Beschreibung der experimentellen Daten ließe sich erreichen, wenn bei erniedrigter Cl^-Konzentration die Geschwindigkeitskonstanten k_{cb} (Bindung von Cl^- an den Carrier an der Außenseite) und k_{ca} (Translokation des unbeladenen Carriers von außen nach innnen) verkleinert würden. Bei der Änderung von 529 auf 459 mM Cl^- muß k_{cb} um den Faktor 1868 verkleinert werden (Mittelwert aus 3 Messungen), um die Kurve bei 310mM Cl^- zu beschreiben muß k_{cb} um den Faktor 4411 kleiner werden, bei 170 mM Cl^- schließlich sinkt k_{cb} auf 1/6680tel seines Ausganswerts. Einer Änderung der Cl^--Konzentration um den Faktor 4 stünde demnach eine Änderung von k_{cb} um den Faktor 6680 gegenüber.

Derartig drastische Änderungen von Geschwindigkeitskonstanten bei viel geringeren Änderungen der Substratkonzentration lassen sich ohne weitere Annahmen nicht erklären. Auch ist schwer vorstellbar, daß sowohl Jodid und

Benzolsulfonat, als auch Sorbit Änderungen am Transportzyklus an zwei verschiedenen Stellen gleichzeitig bewirken. Aus diesen Gründen wird diese Interpretationsmöglichkeit, daß k_{cb} und k_{ca} erniedrigt werden verworfen.

unkompetitive Hemmung

Es sollte noch eine weitere Möglichkeit diskutiert werden, diejenigen Änderungen der IU-Kurven zu interpretieren, die mit einer veränderten Carrierdichte N beschrieben wurden. Dabei wird (nach Läuger 1982) von folgender Überlegung ausgegangen:
Wenn an der Außenseite $2Cl^-$ Ionen gebunden werden, verändert sich möglicherweise das Potentialprofil in der Nähe des Transportmoleküls. Dabei kann man sich vorstellen, daß die Energiebarriere für einen Reaktionsschritt erhöht wird. In der Modellrechnung wurde dies so berücksichtigt, daß zusätzlich zur Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cb} die beiden Geschwindigkeitskonstanten k_{ac} bzw k_{ca} um den jeweils gleichen Faktor verkleinert wurden. Die aus einer solchen unkompetitiven Hemmung resultierenden IU Kennlinien sind in Abbildung 30 in Modell B dargestellt. Als Vergleich dazu wurde in Modell A die Kurven gezeigt, die bei Variation von k_{cb} und N erreicht wurden.

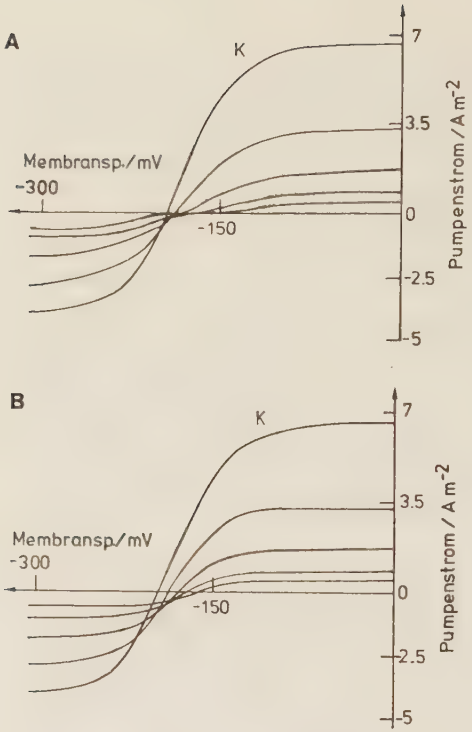

Abbildung 30 Zwei 3-Zustandsmodelle und die daraus resultierenden IU-Kurven. In Modell A gehen die IU-Kurven bei niederer Cl^- -Außenkonzentration in Kurven mit 3 Wendepunkten über, in Modell B nicht.

Unterschiede sind erst bei niederen Cl^- -Konzentrationen erkennbar und zwar gehen in Modell A die IU -Kurven in Kennlinien mit 3 Wendepunkten über. In Modell B hingegen behalten sie ihren einfach sigmoiden Verlauf. Ein Vergleich mit den gemessenen IU - Kurven der Abbildungen 10 und 11 zeigt, daß die Anpassung an Modell A die bessere Beschreibung ist.

5.1.4 Schlüsse

Zusammenfassend kann man die Ergebnisse der Untersuchung über Cl^- Abhängigkeit der Pumpe auf folgende Aussagen verdichten:

- Der Carrier ist elektrisch neutral, der Substrat--Carrier Komplex ist zweifach negativ geladen.
- Erniedrigung der Cl^--Außenkonzentration führt zu einer quadratischen Verkleinerung der Geschwindigkeitskonstanten k_{cb} gemäß der Beziehung $k_{cb}=\overline{k_{cb}}*(Cl^-)^2$. Daraus wird die Stöchiometrie von 2 Cl^--Ionen pro Transportzyklus bestätigt.
- Die Erniedrigung der aktiven Carrierdichte N bei fallender Cl^- -Konzentration und damit steigender Konzentration des Ersatzions, läßt auf eine unspezifische Bindungstelle, aber spezifischen Transportschritt schließen.
- Die Erhöhung der Carrierdichte N bei fallender Ionenstärke könnte auf einen Regelmechanismus zur Erhaltung der Ionenflüsse schließen lassen.

5.2 Substratabhängigkeit der stationären IU -Kurven der Membran

Die wesentliche Aussage bei der Untersuchung des

Einflusses variierter Cl^- Konzentrationen auf die stationären IU-Kurven der Membran war, daß die gefundenen Unterschiede in den Leitfähigkeiten in der Tendenz (nicht in Absolutwerten) mit den beschriebenen Leitfähigkeitsänderungen der ECP aufgrund veränderter Carrierdichten erklärbar sind (vgl Tabelle 3, sowie Abbildungen 16 und 17). Daraus folgt

- Die bei den IU-Kurven auftretenden Effekte durch veränderte Cl^--Konzentration sind durch die Veränderung der Carrierdichte N der ECP erklärbar.

- Die passiven Anteile der IU -Kurve sind durch Cl^- Konzentrationsänderungen nicht beeinflußt worden.

Eine interessante Frage ist, wie der beobachtete Übergang einer IU Kurve, die im Zeitbereich $t<1$ s gemessen wird, in eine IU Kurve mit negativer Steigung im Zeitbereich $t>5$ s, auf reaktionskinetischer Basis verstanden werden kann. Dazu müssen die bisher verwendeten reaktionskinetischen Modelle erweitert werden. Alle bisherigen Reaktionszyklen waren charakterisiert durch einen Ladungstransportschritt, sogenannte "class-I-models". Zur Erzeugung einer IU -Kurve mit Bereichen negativer Steigung wird ein weiterer ladungstransportierender Schritt benötigt. Dies führt zu "class-II-models". In Abbildung 32 ist ein solches Modell gezeigt. Zur Deutung der IU-Kurven der ECP reicht es aus, einen spannungsabhängigen Austausch von Carrierzuständen im eigentlichen Transportzyklus (geschlossene Schleife) mit einem Carrierzustand außerhalb des Zyklus zu postulieren:

Der Übergang von Zustand 2 nach 3 endet in einer "Sackgasse", d.h. es kann hierdurch kein stationärer Strom über die Membran fließen. Die Formel für den Strom in Abhängigkeit von der Membranspannung kann in Analogie zu Gleichung (9) entwickelt werden.

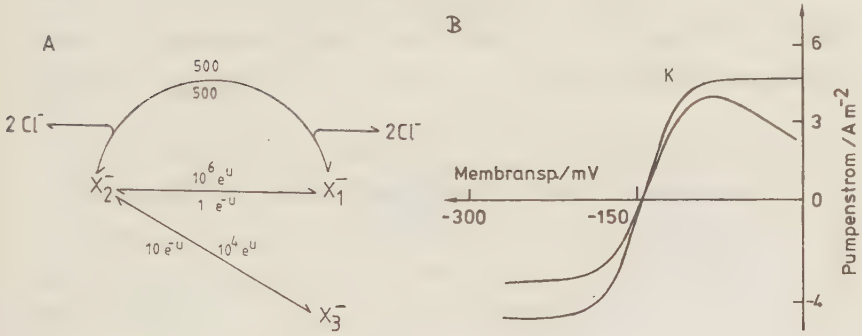

Abbildung 32
3-Zustandsmodell mit zwei spannungsabhängigen Schritten. In Abbildung 32 B sind die aus dem Modell aus Teil A resultierenden IU-Kurven gezeigt.

Die im Reaktionszyklus in Abbildung 32A angegebenen Größen der Geschwindigkeitskonstanten ergeben die beiden IU Kurven (Abb. 32B). Für die Kontrollkurve (2-Zustandsmodell) wurde $k^{o}_{23}=0$ gesetzt, die Kurve mit der negativen Steigung wird für $k^{o}_{23}=$ 1000 erzeugt. Für diese spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten wird diegleiche Spannungsabhängigkeit angenommen wie für k_{12} bzw. k_{21} (vgl. Gl. 5a,b).

5.3 Erweiterung der Diskussion der reaktionskinetischen Modelle auf den nicht stationären Bereich

Die in der Einleitung skizzierte Herleitung des zeitabhängigen Widerstands, der Impedanz, des 2-Zustands-modells führte zu der Formel:

$$g = g_o \frac{1 + p/(\kappa_{io}+\kappa_{oi})}{1 + p\tau_n} \qquad 39$$

Durch Koeffizientenvergleich mit der Impedanz des Ersatzschaltbilds aus Abb. 9 lassen sich folgende Größen direkt berechnen (Hansen et al 83):

$$g_o = \frac{z^2F^2}{2RT}N \frac{(k_{oi}(k_{io}+\kappa_{io})+k_{io}(k_{oi}+\kappa_{oi}))(\kappa_{io}+\kappa_{oi})}{K^2}$$

$$\text{mit } K = k_{io} + k_{oi} + \kappa_{io} + \kappa_{oi}$$

$$c_p = \frac{g_o}{K} \frac{k_{oi}+k_{io}}{\kappa_{oi}+\kappa_{io}} \qquad 40\,a,e$$

$$g_s = c_p K$$

$$\tau_n = K^{-1}$$

Die in Kapitel 4 verwendeten elektrischen Größen zur Darstellung der Ergebnisse sind damit auf kinetische Größen zurückgeführt.

Die Frage ist nun, wie man die Geschwindigkeitskonstanten aus den gemessenen Größen ermitteln kann. Eine Vereinfachung kann man vornehmen, indem man $\kappa_{io}=\kappa_{oi}=\kappa$ setzt. Diese Vereinfachung ist durch die betragsmäßige Ähnlichkeit der Sättigungsströme der stationären IU- Kurven rechtfertigt. (z.B. für das in Abbildung 11 gegebene Beispiel 4,2 und -3,8

A m^{-2}). Weiterhin wird nur für die Membranspannung $V_m = E_p$ = -190 mV gerechnet, da dann die Geschwindigkeitskonstanten $k_{io} = k_{oi}$ sind, wegen der Gültigkeit von $\kappa_{oi} = \kappa_{io}$.

Somit ist

$$\tau_n = 2\ (k+\kappa) = 0{,}68 \text{ ms} \qquad 41$$

(vgl Tabelle 4) Daraus folgt für $K = (\tau)^{-1} = 1462\ s^{-1}$. Ferner gilt:

$$g_o = N\ z^2F^2/2RT\ \ k\ /(k+\kappa) \quad = 58\ S\ m^{-2}$$

$$c_p = g/K\ \ k/\kappa \quad = 35\ mFm^{-2} \qquad 42a,c$$

$$g_s = c_p\ \ K \quad = 51\ S\ m^{-2}$$

Aus diesen Größen kann man nun die absoluten Geschwindigkeitskonstanten k und κ errechnen und erhält $k = 343\ s^{-1}$ und $\kappa = 388\ s^{-1}$. Aus Gleichung 42a ergibt sich dann die Carrierdichte N zu 40 nmol m^{-2}. Damit ist die Carrierdichte N zum aus experimentellen Daten bestimmt.

Mit Kenntnis der absoluten Geschwindigkeitskonstanten läßt sich N auch über einen anderen Weg errechnen:

Die Sättigungsströme der IU -Kurven im 2-Zustandsmodell erhält man aus Gleichung (11).

$$i_{sat} = zFN\kappa \qquad 43$$

Für $i_{sat} = 4\ A\ m^{-2}$ (vgl Abb 11, 12, 13) und $\kappa = 388\ s^{-1}$ ergibt sich N zu 50 nmol m^{-2}. Dieser Wert stimmt gut mit dem oben berechneten überein.

Mithilfe dieser Werte für k, κ und N läßt sich die Spannungsabhängigkeit der Parameter c_p, g_o, und g_s nach Gleichung (42a,c) errechnen.

In Abbildung 32 wurde die errechnete Abhängigkeit von c_p von der Membranspannung aufgetragen. Für die Rechnung wurden folgende Werte verwendet: N=60 nmol m^{-2}, z=-2, $k_{io}=k_{oi}=250$ s^{-1} (bei der Spannung $V_m=-190$ mV) und $\kappa_{io}=\kappa_{oi}=500$ s^{-1}. Die Werte stimmen zwar nicht exakt mit denen überein, die im vorigen Absatz errechnet wurden. Im Rahmen der statistischen Streuung scheinen diese Parameter auf jeden Fall gerechtfertigt zu sein, da sie in keinem Fall um mehr als 40% von den berechneten abweichen.

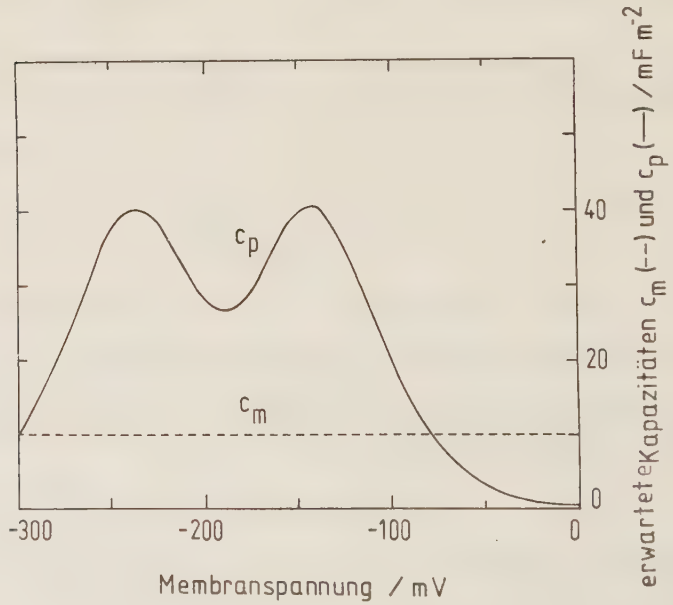

Abbildung 32
Errechete Abhängigkeit der Kapazität c_p von der Spannung und erwartete Membrankapazität c_m = 10 mF m^{-2}.

Die Werte von c_p zeigen eine deutliches Minimum bei -190 mV

mit Ansteigen nach beiden Seiten bis -120 mV bzw -240 mV. Für noch größere Spannungsauslenkungen fällt c_p wieder sehr stark ab.

Diese Kurvenform kann man folgendermaßen erklären: Gleichung 40b kann umgeschrieben werden in

$$c_p = g_o * 1/(\kappa_{io} + \kappa_{oi}) * (k_{oi}+k_{io})/(k_{oi}+k_{io}+\kappa_{oi}+\kappa_{io}) \quad 44$$

Der Faktor $1/(\kappa_{io}+\kappa_{oi})$ ist spannungsunabhängig und trägt nur zur Skalierung bei. Die Werte von g_o haben ein Optimum (siehe weiter unten) mit einem Gipfel bei -190 mV. Die Breite der Kurve ist gegeben durch das Verhältnis des Produkts der spannungsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten k_{ij} zu dem Produkt der spannungsunabhängigen κ_{ij}. Für große Werte von k_{ij} ist die Breite limitiert entsprechend Gleichung (46), d.h. die Spannungsabhängigkeit sehr ausgeprägt.

Der Faktor $(k_{oi}+k_{io})/(k_{io}+k_{oi}+\kappa_{io}+\kappa_{oi})$ wiederum ist für sehr große Werte k_{ij} unabhängig von der Spannung (man kann dann κ_{ij} im Nenner vernachlässigen und der Faktor ergibt 1). Wenn die Geschwindigkeitskonstanten κ_{ij} gleichgroß oder größer als die k_{ij} werden, so zeigt der Faktor ein Minimum bei -190 mV.

In der Abbildung 32 ist zur Berechnung von c_p nach Gleichung (44) $\kappa_{ij}=2k_{ij}$ (bei -190 mV). Dies erklärt das Zustandekommen des gezeigten Kurvenverlaufs mit dem Minimum bei -190 mV. Der Vergleich mit Abbildung 24 zeigt die Übereinstimmung zwischen gemessener und errechneter Kurve.

In Abbildung 33 ist die Abhängigkeit der Leitfähigkeit g_o von der Spannung aufgetragen. Es ergibt sich eine "Glockenkurve" mit einem Maximum bei -190 mV und einem Abfall sowohl für höhere als auch für niederere Spannungen. Ein Vergleich mit Abb. 23 zeigt prinzipielle Übereinstimmung zwischen der gemessenen und errechneten Kurve, wenn auch die gerechnete Kurve eine höhere Halbwertsbreite hat.

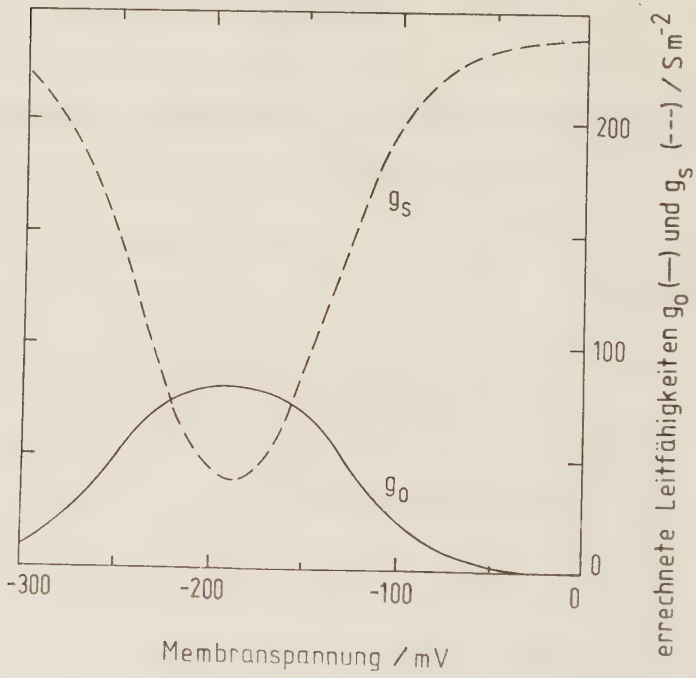

Abbildung 33
Abhängigkeit der Leitfähigkeit g_o und der Serienleitfähigkeit g_s von der Spannung.

Abbildung 33 zeigt, daß für die Leitfähigkeit g_s ein deutliches Minimum bei V=-190 mV erwartet wird. Dieser Kurvenverlauf konnte in den Experimenten nicht bestätigt werden. Andererseits sprechen die Werte aus Abb. 24 auch nicht gegen die Gültigkeit der errechneten Kurve; die Größenordnungen der Leitfähigkeiten stimmen zumindest überein (80 S m^{-2} gemessen und 50 S m^{-2} errechnet (Abbildung 35)). Eine Erklärung für diese Diskrepanz zwischen Theorie und Experiment steht noch aus.

Jedoch gibt die Übereinstimmung der Größen c_m, c_p, und g_o ausreichend Anlass an die Gültigkeit der theoretischen Herleitung der angeführten Größen zu glauben. Wie kann man nun die etwas abstrakten einzelnen Größen c_m, c_p, g_s, g_o physikalisch anschaulich verstehen?

Einfach ist dies bei der "normalen" Membrankapazität c_m. Sie ist bekannterweise Ausdruck der Lipiddoppelschicht von biologischen Membranen, die als elektrischer Isolator zwischen den Leitungen innerhalb und außerhalb der Zelle wirkt. c_p kann man sich als einen pool von Ladungen in der Membran vorstellen, die je nach Membranspannung umverteilt werden. Diese Ladungen sind als geladene Substrat-Carrier Komplexe der elektrogenen Pumpe zu verstehen, deren Verteilung innerhalb der Membran je nach herrschendem elektrischen Feld eingestellt wird. Die Geschwindigkeit dieser Ladungsverteilung wird durch die beiden Leitfähigkeiten g_o und g_s mitbestimmt, wobei g_o die stationäre (d.h. zeitlich unabhängige) Leitfähigkeit beschreibt. g_s ist nur

durch nichtstationäre Messungen zu erfassen.

Die Erweiterung der Untersuchung der ECP auf nicht stationäres Verhalten der Leitfäigkeiten brachte folgende Erkenntnisse:

- Die Übereinstimmung zwischen errechneten (Abb.32 und 33) und gemessenen (Abb. 23 und 24) Kurven läßt den Schluß zu, daß die erhaltenen Ergebnisse auf Eigen - schaften der ECP zurückgeführt werden können.

- Von den gemessenen Zeitkonstanten ausgehend, konnten die absoluten Größen der Geschwindigkeitskonstanten angegeben werden.

- Die Carrierdichte konnte zu ca. 50 nmol m^{-2} bestimmt werden.

- Die spannungsabhängige Kapazität c_p ist eine intrinsische Eigenschaft der ECP.

Da bei der theoretischen Herleitung der Impedanz keine Einschränkungen der Allgemeingültigkeit gemacht wurden, müßte ein c_p auch bei anderen Ladungstransportsystemen gefunden werden. Die hochauflösenden Frequenzganganalysen scheinen hierfür das geeignete Mittel zu sein.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Gradmann für die Anregung zu dieser Arbeit und die vielen Stunden fruchtbarer Diskussion. Herr Prof. Dr. U.-P. Hansen half mir viel beim Verständis der Frequenzganguntersuchungen und ermöglichte mir, die Frequenzgänge im Rechenzentrum der Universität Kiel durchzurechnen. Den Männern der Werkstatt, Herrn Bauer und Hansi Schiefele danke ich für ihre stete Hilfe in "Notfällen". Herr Manfred Krella hat einen Teil der Zeichnungen angefertigt, wofür ich mich ebenfalls bedanke.

6. Zusammenfassung

- Verringerung der Cl^- Außenkonzentration führt zur Verkleinerung des positiven und negativen Sättigungsstroms (ca. + 4 A m^{-2}) und der Steigung der Stromspannungskurven der Pumpe, wenn Cl^- durch Jodid, Benzolsulfonat oder Bicarbonat ersetzt wird.

- Verringerung der Cl^- Außenkonzentration durch Zugabe isotonischer Sorbitlösung ergibt ein Anwachsen der Sättigungsströme und eine Verkleinerung der relativen Leitfähigkeit der Pumpe.

- Die Carrierdichte steigt leicht an, wenn Cl^- durch Sorbit ersetzt wird und fällt ab, wenn Cl^- durch andere Ionen ersetzt wird.

- Veränderungen der stationären Membranstromspannungskurven sind konsistent mit den Änderungen der Cl^--Pumpe bei variierter Cl^--Konzentration.

- Eine reaktionskinetische Analyse der Daten kann durchgeführt werden und ergibt folgende Schlüsse:

- Transportstöchiometrie von $2Cl^-$ pro Transportzyklus

- zweifach negative Ladung des Substratcarrierkomplexes

- Energetisierung der Pumpe im spannungsabhängigen Teil des Tranportzyklus

- Bindung und Abgabe von Cl^- sind sehr schnelle Reaktionen (ca. 10^{-5} s^{-1}) .

- Carrierdichte in der Membran von ca. 60 nmol m^{-2}

- limitierende Geschwindigkeitskonstante von ca. 500 s^{-1}. Dies ist die Umsatzrate des Transportsystems in der Sättigung.

- spannungsabhängige Umverteilung geladener Zustände des Transportzyklus auf kleine Spannungsänderungen äußern sich als "Pumpenkapazität". Diese Pumpenkapazität ist eine intrinsische Eigenschaft aller Transportsysteme mit geladenen Zuständen.

- Membrankapazität von Acetabularia beträgt ca 8 mF m^{-2}.

7. Literaturverzeichnis

Bode, H.W. 1964. Network analysis and feed-back amplifier design. Van Nostrand Comp. Princeton, New Jersey

Cole, K.S. 1968. Membranes, Ions and Impulses. University of California Press, Berkely and Los Angeles

Cole, K.S. 1982. Squid axón membrane: Impedance decrease to voltage-clamp. Ann. Rev. Neurosci. 5: 305-323

Conti, F., Neumcke, B., Nonner, W., Stämpfli, R. 1980. Conductance fluctuations from the inactivation process of sodium channels in myelinated nerve fibres. J. Physiol. 308: 217-239

Dieter, U. 1979. Die Cl^--Spezifität der elektrogenen Cl^--Pumpe bei Acetabularia. Zulassungsarbeit, Universität Tübingen.

Dimroth, P. 1982. The generation of an electrochemical gradient of sodium-ions upon decarboxylation of oxaloacetate by membrane-bound and Na+-activated oxaloacetate decarboxylase from Klebsiella aerogenes. Eur. Journal of Biochem. 121: 443-449

Freudling, C., Gradmann, D. 1979. Cable properties and compartmentation in Acetabularia. Biochem. Biophys. Acta 93: 358-365

Goldman, L., Hahin, R. 1978. Initial conditions and the kinetics of the sodium conductance in Myxicola giant

axons. II. Relaxation Experiments. J. Gen. Physiol 72: 879-898

Gradmann, D. 1970. Einfluss von Licht, Temperatur und Außenmedium auf das elektrische Verhalten von Acetabularia. Planta 93: 323-353

Gradmann, D. 1975. Analog circuit of the Acetabularia membrane. J. Membrane Biol. 25: 183-208

Gradmann, D., Hansen, U.-P., Slayman, C.L. 1982a. Reaction kinetic analysis of current-voltage relationships for electrogenic ion pumps in Neurospora and Acetabularia. In: Electrogenic Ion Pumps, C.L. Slayman, editor. (Current Topics in Membranes and Transport) Vol. 16 pp 257-276 Academic Press, New York

Gradmann, D., Tittor, J., Goldfarb, V. 1982b. Electrogenic Cl^- pump in Acetabularia. Phil. Trans. R. Soc. London B 299: 447-457

Hansen, U.-P., Gradmann, D., Sanders, D., Slayman, C.L. 1981. Interpretation of current-voltage relationships for "active" ion transport systems: I. Steady-state reaction--kinetic analysis of class-I mechanisms. J. Membrane Biol. 63: 165-190

Hansen, U.-P., Gradmann, D., Tittor, J., Sanders, D., Slayman, C.L. 1982. Kinetic analysis of active transport: reduction models. In: Plasmalemma and Tonoplast: Their functions in the plant cell. Marmé, D., Marrè, E., Hertel,

R. editors. Elsevier Biomedical Press, B.V.

Hansen, U.-P., Tittor, J., Gradmann, D. 1983. Interpretation of current- voltage relationships for "active" ion transport systems: II. Nonsteady-state reaction kinetic analysis of class-I mechanisms. J. Membrane Biol. in press

Hladky, S.B. 1979. Ion transport and displacement currents with membrane-bound carriers. The theory for voltage-clamp currents, charge-pulse transients and admittance for symmetrical systems. J. Membrane Biol. 46: 213-237

Karlish, S.J.D., Yates, D.W., Glynn, I.M. 1978. Conformational transitions between Na^+-bound and K^+-bound forms of (Na^+ + K^+)-ATPase, studied with formycin nucleotides. Biochim. Biophys. Acta 552: 252-264

Keck, K. 1964. Culturing and experimental manipulation of Acetabularia. In: Methods in Cell Physiology. D.M. Prescott, editor. Vol.1, pp 189-213 Academic Press, New York

Lang, J., Müller, R. 1971. A procedure for nonlinear least square refinement in adverse practical conditions. Computer Physics Communications 2: 79-86

Läuger, P., Stark, G. 1970. Kinetics of carrier-mediated ion transport across lipid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta 211: 458-466

Läuger, P. 1979. A channel mechanism for electrogenic ion pumps. Biochim. Biophys. Acta 552: 143-161

Läuger, P. 1982. Microscopic calculation of ion-transport rates in membrane channels. Biophys. Chemistry 15: 89-100

Lozier, R., Niederberger, W. 1977. The photochemical cycle of bacteriorhodopsin. Fed. Proc. 36: 1805-1809

Milsum, J.H. 1966. Biological control systems analysis. Mc Graw Hill Book Comp. New York

Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature (London) 191: 144-148

Mummert, H., Hansen, U.-P., Gradmann, D. 1981. Current--voltage curve of electrogenic Cl^- pump predicts voltage-dependent Cl^- efflux in Acetabularia. J. Membrane Biol. 62: 139-148

Rosenberry, T.L. 1979. Quantitative simulation of endplate currents at neuromuscular junctions based on the reaction of Acetylcholine with Acetylcholin receptor and Acetylcholinesterase. Biophys. J. 26: 263-290

Saddler, H.D.W. 1971. Spontaneous and induced changes in the membrane potential and resistance of Acetabularia mediteranea. J. Membrane Biol. 5: 250-260

Sakmann, B., Patlak, J., Neher, E. 1980. Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. Nature (London) 286: 71-73

Sanders, D., Hansen, U.-P., Gradmann, D., Slayman, C.L. 1984. Generalized kinetic analysis of ion-dependent cotransport systems: a unified interpretation of selective ionic effects on michaelis parameters. J. Membrane Biol., eingereicht

Skou, J.C. 1982. The (Na^+-K^+)-ATPase: Coupling of the reaction with Na^+ and K^+. Ann. N. Y. Acad. Science Vol. 402, pp 169-184

Strobel, H. 1968. Systemanalyse mit determinierten Testsignalen. VEB Verlag Technik, Berlin

Varjú, D. 1977. Systemtheorie. Heidelberger Taschenbücher Bd. 182. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Wikström, M.K.F. 1973. The different cytochrome b components in the respiratory chain of animal mitochondria and their role in electron transport and energy conservation. Biophys. Biochim. Acta, 301: 155-193

Lebenslauf

Jörg Tittor, geboren am 13. 11. 1954 in Ellwangen als Sohn des Walther Tittor und seiner Frau Brunhilde geb. Slawik

1960 - 1964 : Volksschule Gosbach/Kr. Göppingen

1964 - 1967 : Schüler am Gymnasium Geislingen/Steige

1967 - 1973 : Schüler am Schubart-Gymnasium Aalen

Juni 1973 : Abitur

1973 - 1974 : Wehrdienst in Dornstadt/Ulm

WS74 - WS82 : Studium der Biologie und Physik an der Universität Tübingen

Mai80-Nov.80: Anfertigung der Zulassungsarbeit bei Prof.Dr. F.W. Bentrup über "Elektrophysiologische Untersuchungen zum Aminosäuretransport bei Riccia fluitans"

November 80 : Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien

Juni 80 - Juli 83: Anfertigung einer Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried unter der Anleitung von Herrn PD. Dr. Gradmann

Meine akademischen Lehrer waren :

Ammermann, Baumann, Bentrup, Bunke, Gönnenwein, Gradmann, Hadeler, Hager, Henning, Kramer, Möhres, Oberwinkler, Pfister, Rähle, Schwemmle, Seitz, Seyffert